



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

Associação de marcadores (AFLP) com caracteres
de interesse agrônômico em clones elite
de cana-de-açúcar (*Saccharum spp*)

Michely Correia Diniz

Recife-PE
Abril 2007

Michely Correia Diniz

Associação de marcadores (AFLP) com caracteres
de interesse agronômico em clones elite
de cana-de-açúcar (*Saccharum spp*)

Dissertação apresentada como
pré-requisito para obtenção do
grau de **Mestre em Genética**,
junto ao Programa de Pós-
Graduação em Genética, área
de concentração em Genética,
do Departamento de Genética,
da Universidade Federal de
Pernambuco.

Orientador: **Prof. Dr. Éderson
Akio Kido**, Depto de Genética,
Centro de Ciências Biológicas,
UFPE.

Recife
Abril 2007

Diniz, Michely Correia

Associação de marcadores (AFLP) com caracteres de interesse agrônômico em clones elite de cana-de-acúcar (*Saccharum spp*) / Michely Correia Diniz. – Recife: O Autor, 2007.

x, 104 folhas : il., fig., tab.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Genética, 2006.

Inclui bibliografia e anexo.

1. Genética molecular 2. Marcadores genéticos 3. Cana-de-acúcar 4. Seleção assistida I. Título.

**577.21
572.8**

**CDU (2.ed.)
CDD (22.ed.)**

**UFPE
CCB – 2007-042**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

PARECER DA COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE

Michely Correia Diniz

“Associação de marcadores (AFLP) com caracteres de interesse agrônômico em clones elite de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*)”

Área de concentração: Genética

A comissão examinadora, composta pelos professores abaixo, sob a presidência do primeiro, considera a candidata

MICHELY CORREIA DINIZ como **APROVADA.**

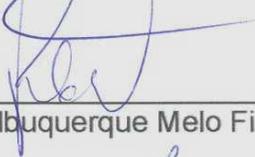
Recife, 10 de abril de 2007.



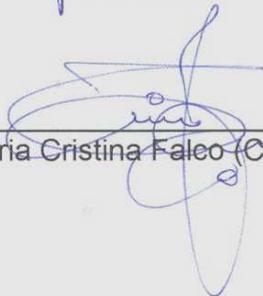
Prof. Dr. Ederson Akio Kido (UFPE) – Orientador



Prof. Dr. Tercílio Calsa Júnior (UFPE) - Membro interno



Prof. Dr. Pericles de Albuquerque Melo Filho (UFRPE) - Membro externo



Dra. Maria Cristina Falco (CTC) – Membro externo

*“Bom Jesus da cana verde
A cana que vos abraça
Dá melão e açúcar bruto
Dá garapa e dá cachaça.”*

(Autor desconhecido)

“Sinto-me em luta comigo mesmo, luta essa que defino com estas palavras: Sei o que devo ser e ainda não sou, mas rendo graças a Deus por estar trabalhando, embora que lentamente, por dentro de mim próprio, para chegar, um dia, a ser o que devo”.

(Chico Xavier)

Agradecimentos

À minha mãe Telma, que nunca poupou sacrifícios em benefício de suas filhas;
às minhas irmãs amadas Rafaella e Dandara que são simplesmente TUDO para
mim.

Ao meu noivo Marcos Victor, por acreditar sempre em nós.

À Tia Graça Mendonça, que literalmente, apoiou-me em tudo, proporcionando-me um lar e muitos carinhos; ao primo Gustavo Mendonça, pelo apoio e conversas agradáveis. Não tenho palavras para agradecer o que vocês fizeram por mim.

À Vó Teresa e titia Márcia pelo carinho.

À grande amiga Pedranne Barbosa (vulgo pedrinha), pela convivência e apoio, sem os quais tudo seria ainda mais difícil, por todos os sorvetes e pelos longos trabalhos na "sala".

Ao Rodrigo Gazzaneo, por sua amizade e pelo jeito irreverente que tornou meus dias mais alegres.

Aos meus estagiários Rafael e Bruno pela ajuda.

Aos colegas do LGM, Thiago Souza (Jimmy), Rodrigo (agouro), José Ribamar Neto, Luciano, D. Zizi e Celuza.

Aos colegas do LGBV, à Claudete, pela disposição em ajudar sempre.

A Romildo pelo bom humor e por fazer tão bem o seu trabalho.

Aos colegas do Mestrado e em especial à Patrícia Pires pela receptividade desde o primeiro dia.

Ao Prof. Dr. Antônio Vargas de Oliveira Figueira e aos colegas do CENA - Piracicaba, pela boa vontade e auxílio; e à Valesca, Jeannedy e Tercílio pela acolhida durante minha estadia em Pira.

Ao Prof. Dr. Paulo Andrade, pelo apoio profissional e pessoal, e por suas palavras em momentos difíceis.

Ao Prof. Dr. Éderson Akio Kido, pela oportunidade de ingresso no Mestrado e orientação.

Ao Programa de Pós-Graduação e ao secretário Lobo pelo auxílio.

Ao CNPq, pelo auxílio financeiro que possibilitou a realização desse trabalho.

A todos que ajudaram de alguma maneira, e àqueles que não ajudaram de maneira alguma me motivando de certa forma a ir além.

À energia divina que sempre me conduziu em todas as curvas dessa caminhada.

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas	ix
Lista de Tabelas e Figuras	x
Resumo	12
1. Introdução	13
2. Objetivos	14
2.1. Geral	14
2.2. Específicos	14
3. Revisão Bibliográfica	14
3.1. Breve Histórico da Cana-de-açúcar no Brasil	15
3.2. Biologia da Cana-de-açúcar	16
3.2.1. Taxonomia e Genética	17
3.2.2. Aproveitamento da Cana-de-açúcar	19
3.3. Melhoramento e Biotecnologia em Cana-de-Açúcar	20
3.4. Marcadores Moleculares em Vegetais	22
3.5. A Técnica de AFLP	26
3.5.1. Fatores que Afetam a Reprodutibilidade do AFLP	31
3.5.2. Vantagens do AFLP	31
3.5.3. Coloração com Prata	31
3.6. Associação Fenótipo-marcador com Detecção de QTL em Cana-de-açúcar	33
3.7. Interação QTLs x Ambientes	38
4. Referências Bibliográficas	40
5. Artigo Científico	51
6. Conclusões	79
7. Anexos	80
7.1. Instruções para Autores da Revista <i>Genetics and Molecular Biology</i>	80
7.2. Ensaio de Produção	83
7.3. Dados Fenotípicos dos Ensaio de Produção	85
7.4. Planilhas de Dígitos Binários	90
7.5. Iniciador PCR Específico	105

Lista de Abreviaturas

AFLP – Polimorfismo de Tamanho de Fragmento Amplificado

BRIX – porcentagem de sólidos solúveis no caldo de cana

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento

CTC – Centro de Tecnologia Canavieira

MAS – Seleção Assistida por Marcador

PCC – Polarização % na cana

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

QTL – Loci de Características Quantitativas

RAPD – Polimorfismo de DNA Amplificado ao acaso

RFLP – Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição

SAMPL - Amplificação Seletiva de Locos Polimórficos Microsatélite

SSR – Seqüências Simples Repetidas

TCH – Tonelagem de cana por hectare

Lista de Tabelas e Figuras

Revisão

Figura 1. Comparação do tamanho dos genomas do sorgo e cana-de-açúcar.....	18
Figura 2. Esquema que resume as quatro etapas do AFLP.....	30

Artigo Científico

Tabela 1. Marcadores AFLP (progênie 234/96) com associação significativa (ANAVA, $p < 0,05$) com Fibra, em diferentes anos, tipo de dose (D), níveis de significância (p), coeficientes de determinação (R^2), e efeitos (%)	73
Tabela 2. Marcadores AFLP (progênie 234/96) com associação significativa (ANAVA, $p < 0,05$) com PCC, em diferentes anos, tipo de dose (D), níveis de significância (p), coeficientes de determinação (R^2), e efeitos (%).....	74
Tabela 3. Marcadores AFLP (progênie 234/96), derivados de diferentes iniciadores, com associação significativa (ANAVA, $p < 0,05$) com TCH, em diferentes anos, tipo de dose (D), com seus níveis de significância (p), coeficientes de determinação (R^2), e efeitos ($t \cdot ha^{-1}$)	75
Tabela 4. Marcadores PCR específicos (progênie 234/96), com associação significativa (ANAVA, $p < 0,05$) com os caracteres, em diferentes anos, tipo de dose (D), com seus níveis de significância (p), coeficientes de determinação (R^2), e efeitos [Fibra e PCC em % e TCH em $t \cdot ha^{-1}$]	76
Figura 1. Gel Parcial (progênie 234/96) AFLP gerado pela combinação E-AAC M-CAT	77
Figura 2. Gel Parcial, com indivíduos 234/96, sinalizando marcas derivadas do iniciador específico ACCCAG31 (C, D, E)	78

Anexos

Tabela 1. Análise da variância parcial para Fibra%, PCC e TCH, referentes aos anos de 2003 e 2004 (cana-planta e cana-soca – Piracicaba) da progênie ‘SP80-180/SP80-4966’	83
Tabela 2. Análise da variância parcial para Fibra%, PCC e TCH, referentes aos anos de 2004 e 2005 (cana-planta e cana-soca –Piracicaba) da progênie ‘SP80-180/SP80-4966’	83

Tabela 3. Análise da variância parcial para Fibra%, PCC e TCH, referentes aos anos de 2004 e 2005 (cana-planta e cana-soca – Jaú) da progênie ‘SP80-180/SP80-4966’	84
Tabela 4. Análise da variância parcial para Fibra%, PCC e TCH, referentes aos anos de 2003 e 2004 (cana-planta e cana-soca – Piracicaba) da progênie ‘SP85-7215 e SP80-144’	84
Tabela 5. Dados Fenotípicos Progênie 234/96	85
Tabela 6. Dados Fenotípicos Progênie 234/96	87
Tabela 7. Dados Fenotípicos Progênie 187/97	89
Planilha 1. Dados relativos a 234/96 com Iniciadores E - ACC / M – CAG	90
Planilha 2. Dados relativos a 234/96 com Iniciadores E - AGC / M – CAT	90
Planilha 3. Dados relativos a 234/96 com Iniciadores E - ACA / M – CTT	91
Planilha 4. Dados relativos a 234/96 com Iniciadores E - AAG / M – CTC	91
Planilha 5. Dados relativos a 234/96 com Iniciadores E - ACT / M – CAC	92
Planilha 6. Iniciadores PCR específicos - Progênie 234/96	93
Planilha 7. Iniciadores PCR específicos - Progênie 187/97	95
Planilha 8. Dados relativos a 234/96 com Iniciadores E - ACG / M – CAA	96
Planilha 9. Dados relativos a 234/96 com Iniciadores E - AGC / M – CAG	97
Planilha 10. Dados relativos a 234/96 com Iniciadores E - AAC / M – CAT	98
Planilha 11. Dados relativos a 234/96 com Iniciadores E - ACA / M – CAC	100
Planilha 12. Dados relativos a 234/96 com Iniciadores E - AGG / M – CAG	101
Planilha 13. Dados relativos a 234/96 com Iniciadores E - AGG / M – CAC	103
Figura 1. Cromatograma Parcial da Seqüência Específica que originou o iniciador	105

Resumo

O Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar que é uma das principais biomassas. O etanol, obtido da fermentação do caldo de cana-de-açúcar, é um combustível potencialmente global, por amenizar dois problemas mundiais, a escassez do petróleo e o efeito estufa. O melhoramento da cana-de-açúcar requer muitas avaliações (diferentes anos e locais), assim sendo o uso de marcadores moleculares pode auxiliar esse processo. A técnica de AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphisms*), de caráter multiplex, é ótima para geração de um grande número de marcadores a partir de poucas combinações de iniciadores. Este trabalho teve por objetivo detectar associações fenótipo-marcador em progênie (234/96) de híbridos de clones elites do melhoramento nacional de cana-de-açúcar, a partir de marcadores AFLP e os caracteres Fibra%Cana, PCC (POL%Cana) e TCH (tonelagem de cana por hectare), oriundos de oito ensaios, que avaliaram os dois ciclos da cultura (cana-planta e cana-soca) em duas localidades (Piracicaba e Jaú, ambas em SP). Foram detectados marcadores associados a prováveis QTLs (locos controladores de caracteres quantitativos), tanto de efeitos positivos quanto negativos, e para os três caracteres, individualmente. Alguns marcadores apresentaram também associação conjunta significativa ($p < 0.05$) para mais de um caráter. A seqüência de DNA de um marcador AFLP possibilitou o desenho de iniciadores específicos que amplificaram via PCR, com DNAs da progênie 234/96, três marcadores de efeitos negativos associados com Fibra%Cana, sendo um deles também associado com TCH e de efeito positivo. Esses marcadores foram considerados promissores para uso em Seleção Assistida, auxiliando os programas de melhoramento.

Palavras-chaves: cana-de-açúcar, AFLP, QTL, Seleção assistida, Programas de Melhoramento.

1. Introdução

O Brasil encontra-se no centro da revolução energética, que acontece no mundo, por produzir um dos principais tipos de biomassa que é a cana-de-açúcar. Embora seja cultivada em mais de 120 países somente como matéria prima do açúcar, no Brasil a sua produção é destinada também ao etanol, combustível potencialmente global, deixando o Brasil numa posição de destaque por implantar em larga escala o álcool como alternativa a escassez do petróleo e ao efeito estufa (Oliveira, 2003).

A Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), na avaliação da safra agrícola de cana-de-açúcar 2006/2007, estimou a produção brasileira em 475,73 milhões de toneladas, sendo um aumento de 10,3 % em relação à safra anterior. Do total produzido, 50,9% destinou-se à fabricação de açúcar; 38,6% à produção de álcool, e o restante 10,5% à fabricação de cachaça, alimentação animal, fabricação de rapadura, açúcar mascavo e outros fins (CONAB, 2006)

Ainda de acordo com a CONAB, a região Nordeste foi responsável por 13,6% da safra 2006/2007, enquanto que a região Sudeste contribuiu com 69%. Isso se deve provavelmente às condições ambientais e de manejo, devido às características intrínsecas das variedades plantadas.

O melhoramento genético da cana-de-açúcar, por sua vez, é dificultado pela complexidade genética da cultura (elevado nível de ploidia e aneuploidia). Além disso, os programas de melhoramento são longos (de 12 a 15 anos) (Mamet and Domaingue, 1999), requerendo grandes populações para os processos seletivos, geralmente de baixa eficiência, e ensaios em diferentes anos e locais. Paralelamente, os ganhos genéticos tendem a diminuir com os ciclos de seleção, em função também de uma base genética relativamente estreita.

Nesse contexto, marcadores moleculares constituem uma importante ferramenta para dissecar geneticamente caracteres de herança complexa, quando associados ao mapeamento genético. Marcadores específicos, detectados em associação com caracteres de interesse agro-industrial, podem auxiliar no planejamento de cruzamentos mais eficientes, bem como na seleção indireta e/ou

precoce de indivíduos promissores, aumentando a precisão na seleção, que poderia ser feita nos primeiros ciclos. Isto pode acarretar um incremento no ganho genético por unidade de tempo, aumentando a eficiência do programa de melhoramento e diminuindo o tempo necessário para lançamento de uma nova variedade (Kido, 2003)

As informações obtidas nesse trabalho, a partir de associações de marcadores do tipo AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism* - polimorfismo de comprimento de fragmento amplificado) e de marcadores derivados de iniciadores específicos com caracteres de interesse agrônômico em cana-de-açúcar, abrem perspectivas interessantes para aplicação futura em seleção assistida.

2. Objetivos

2.1. Geral

Detectar associações fenótipo-marcador em híbridos de clones elites do melhoramento de cana-de-açúcar, envolvendo marcadores moleculares do tipo AFLP e caracteres percentual de fibras (Fibra%Cana), PCC (POL%Cana) e produtividade em tonelagem de cana por hectare (TCH).

2.2. Específicos

- Obter marcadores do tipo AFLP para a progênie derivada dos genitores 'SP80-180 e SP80-4966'.
- Verificar a associação fenótipo-marcador a partir de ensaios de campo disponíveis para a população em estudo.
- Desenvolver iniciadores, a partir de marcadores AFLPs, para amplificação via PCR de fragmentos específicos, que apresentem associação fenótipo - marcador e que sejam detectáveis em progênies do melhoramento de cana-de-açúcar, visando uso futuro em seleção assistida.

3. Revisão Bibliográfica

3.1. Breve Histórico da Cana-de-açúcar no Brasil

A história da cana-de-açúcar no Brasil confunde-se com a própria história de colonização brasileira. Foi trazida pelos portugueses em meados de 1500, com o objetivo de levar açúcar para a Europa, e colonizar o País com maior eficiência, evitando a invasão por outros povos. Então, é comum uma associação da cultura às mazelas de um Brasil, colônia, escravagista e comandado por grandes senhores de Terra, que recebiam grandes privilégios do governo. A realidade hoje é muito distinta. A cultura de cana é o único *commodities* que não é exportado *in natura*, como a soja, o milho e outras, assim, 100% do que é exportado, sofre algum grau de transformação no país, gerando emprego e renda no entorno das regiões produtoras (Resende, 2003).

Hoje, a cana possui dois produtos principais: o açúcar e o álcool, o que possibilita a diversificação da produção em função dos preços praticados no mercado. Especialmente no Brasil, em meados dos anos 70, surgiu o maior programa de biocombustível do mundo, o Pró-Álcool. Este programa, justificado inicialmente pela alta do petróleo no mercado mundial, hoje é uma das alternativas energéticas, aplicadas em larga escala, mais ecológicas do planeta, uma vez que além de possibilitar a redução do uso de energia fóssil (a partir de petróleo, etc.) possui, especificamente no Brasil, o balanço energético mais positivo que se conhece para biocombustíveis, variando de 9 a 12. Isso significa que para cada unidade de energia gasta para se produzir o álcool, sua queima possibilita a geração de 9 a 12 unidades energéticas. Esses valores são muito maiores que em outros países como EUA e Cuba, que raramente chegam a 3 (SEBRAE, 2005).

Esses valores fortemente positivos no Brasil são devido à utilização de bagaço de cana nas caldeiras, gerando energia. Aliás, hoje, praticamente toda a energia gasta na fabricação de açúcar e álcool é proveniente dessa fonte, ainda gerando excedentes para serem vendidos no mercado. Além disso, a vinhaça, efluente líquido da fabricação de álcool e açúcar é utilizada na adubação dos canaviais, é uma excelente fonte de potássio e outros nutrientes. O resíduo sólido

mais conhecido como torta de filtro, também é utilizado na adubação dos canaviais. Nesse sentido a cana-de-açúcar é hoje, uma das culturas que mais se destaca do ponto de vista econômico, social e ambiental (Resende, 2003; SEBRAE, 2005).

3.2. Biologia da Cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar é uma monocotiledônea cultivada em regiões tropicais e subtropicais do mundo, primordialmente por sua capacidade de armazenar altas concentrações de sacarose, ou açúcar, nos internós do colmo. A sua reprodução é normalmente vegetativa através de segmentos nodais, contudo a propagação de sementes também ocorre (Bakker, 1999).

A cana é uma planta do grupo C₄, possuindo maior eficiência fotossintética devido, provavelmente, à compartimentação de enzimas e às características anatômicas das folhas, tendo como consequência taxa de fotorrespiração baixa ou ausente (Machado, 1987). Ainda segundo este autor, a produtividade da cana-de-açúcar depende da eficiência da integração do seu sistema produtivo formado pelas folhas fotossinteticamente ativas; do escoamento e distribuição do produto fotossintetizado; do consumo pela planta no seu desenvolvimento e reprodução; e do acúmulo e armazenamento de sacarose.

As variedades cultivadas da cana moderna para produção de açúcar são híbridos complexos interespecíficos (*Saccharum* spp.) que envolve cruzamentos entre as espécies *Saccharum officinarum* L. e *S. spontaneum* L. (Cox *et al.*, 2000) e que têm surgido através da seleção de espécies dentro do gênero *Saccharum*.

S. officinarum ou a “cana nobre” acumula altos níveis de sacarose nos colmos, contudo apresenta pouca resistência a doenças. Acredita-se que *S. officinarum* seja produto do complexo da introgressão entre *S. spontaneum*, *Erianthus arundinaceus* e *Miscanthus sinensis* (Daniel and Roach, 1987). Uma possível forma intermediária no desenvolvimento de *S. officinarum* é *S. robustum*, uma espécie praieira que cresce nos trópicos úmidos com muitas populações distintas. A origem de *S. officinarum* está intimamente associada com a atividade

humana, uma vez que ela é genuinamente cultivada, não sendo encontrados membros selvagens (Sreenivasan *et al.*, 1987). Acredita-se que o centro de origem de *S. officinarum* seja a Polinésia. As espécies provavelmente foram transportadas pelo Sudeste da Ásia, sendo direcionadas para um moderno centro de diversidade em Papua Nova Guiné, onde a maioria das espécies foi coletada no século XVIII (Daniel and Roach, 1987).

3.2.1. Taxonomia e Genética

A cana pertence ao gênero *Saccharum*, da tribo Andropogoneae na família das gramíneas (Poaceae) (Daniel and Roach, 1987). A tribo inclui gramíneas tropicais e subtropicais, como o sorgo e o milho. A taxonomia e filogenia da cana são complicadas, pois há plantas de cinco gêneros que dividem características comuns e forma um grupo muito relacionado conhecido como o complexo “*Saccharum*”, que engloba os gêneros *Saccharum*, *Erianthus* divisão *Ripidium*, *Miscanthus* divisão *Diandra*, *Narenga* e *Sclerostachya* (Daniel and Roach, 1987). Esses gêneros são caracterizados pelo alto nível de ploidia e números desbalanceados de cromossomos (aneuploidias), dificultando a determinação taxonômica (Daniels and Roach, 1987; Sreenivasan *et al.*, 1987).

O genoma da cana é muito grande. Por exemplo, o tamanho do genoma não replicado de uma célula somática (2C) é 7440 Mpb em *S. officinarum* ($2n = 80$). Contudo como *S. officinarum* é octaplóide, o tamanho do genoma monoplóide - que é o tamanho de um conjunto cromossômico completo não redundante - é oito vezes menor, por volta de 930 Mpb. Este valor é comparado ao tamanho do genoma de um gameta (1C) de um típico cultivar diplóide. Na realidade, não é muito maior que o tamanho do genoma do sorgo (cerca de 760 Mbp) (**Figura 1**) e cerca de duas vezes o genoma do arroz (430 Mbp). O genoma monoplóide de *S. spontaneum* é 750 Mbp, por volta de 80% do genoma de *S. officinarum* (Grivet and Arruda, 2001).

A conservação da organização cromossômica entre as gramíneas possui um grande potencial na localização e identificação de genes de interesse em cana-de-açúcar. A colinearidade entre cromossomos de cana e sorgo significa que

genes identificados em uma espécie podem também ser encontrados na outra, no mesmo local e em mesma ordem (Guimarães *et al.*, 1997; Ming *et al.*, 1998).

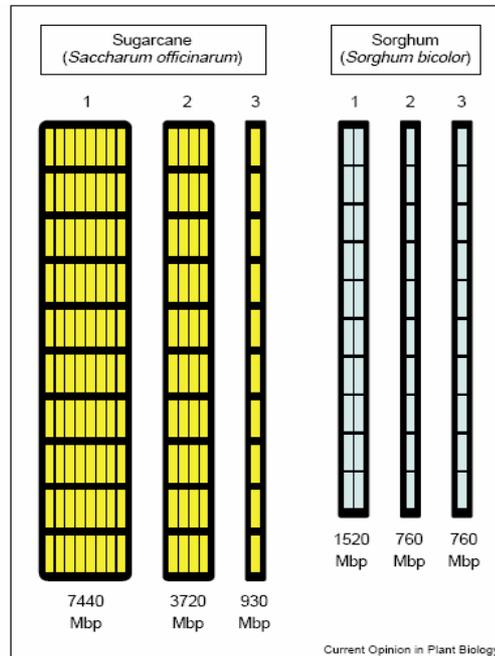


Figura 1: Comparação do tamanho dos genomas do sorgo e da cana-de-açúcar. Cada barra representa um cromossomo, que alinhados na horizontal são homólogos. O genoma não replicado de uma célula somática (2C) é representado por (1). O gameta não replicado (1C) é mostrado em (2). O conjunto monoplóide está esquematizado em (3). Fonte: Grivet and Arruda, 2001.

O gênero *Saccharum* compreende seis espécies: *S. spontaneum*, *S. officinarum*, *S. robustum*, *S. edule*, *S. barberi*, e *S. sinense* (D'Hont *et al.*, 1998). *S. officinarum* tem $2n = 80$ cromossomos com um número básico (x) de 10, confirmando o seu caráter poliplóide (ter mais que dois conjuntos cromossômicos, como por exemplo, a octaploidia, $2n = 80$ – oito conjuntos completos de cromossomos). Contudo, *S. officinarum* não é um simples poliplóide. Ele é um híbrido complexo de diferentes espécies, possuindo dois ou mais conjuntos cromossômicos diferentes (Sreenivasan *et al.*, 1987). Isto é indicado pelos cromossomos em *S. officinarum* que são homólogos com aqueles do gênero *Misacanthus* e *Erianthus* divisão Ripidium (Besse *et al.*, 1977; Daniel and Roach, 1987). Já *S. spontaneum* apresenta um genoma menor, altamente polimórfico, relativamente resistente a doenças e possui alto conteúdo de fibras, sendo uma

espécie altamente vigorosa, com $2n = 40$ a 128 cromossomos. (Sreenivasan *et al.*, 1987; D'Hont *et al.*, 1996). Ela pode ser diferenciada da *Saccharum* cultivada, pela cana fina e inflorescência estreita (Pursglove, 1972).

3.2.2. Aproveitamento da Cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar pode ser aproveitada de diversas formas, as mais importantes, e utilizadas pela indústria são:

a) Produção de açúcar

A cana é primordialmente cultivada para a produção de açúcar, que se inicia pela moagem da cana. Ela é picada e seu suco é extraído por esmagamento. O suco é então clarificado por uma combinação de cal $[Ca(OH)_2]$ e fósforo produzindo um precipitado de fosfato de cálcio que sedimenta também outras impurezas. O suco de açúcar clarificado é então concentrado por evaporação para produção do "xarope", que passa por várias fases de cristalização para a geração do açúcar (Mackisntosh, 2000).

Há duas importantes medidas da qualidade da cana-de-açúcar. De acordo com Rodrigues (2005) são elas: Brix e Pol.

-Brix: porcentagem, em peso, de sólidos solúveis no caldo de cana. Representa o peso de sólidos dissolvidos em 100 g de solução. Assim, quando uma solução tem 20° Brix, quer dizer que em 100 g desta solução tem 20 g de sólidos dissolvidos, sendo os 80 g restantes de água.

-Polarização ou Pol: porcentagem, em peso, de sacarose aparente ou a soma algébrica dos desvios provocados no plano de polarização pelas substâncias opticamente ativas (açúcares), contidos nos produtos da usina (caldo), por leitura direta. Na prática, quantidade de sacarose encontrada em 100 g da solução. Assim, quando uma solução tem Pol de 14, quer dizer que em 100 g desta solução temos 14 g de sacarose.

Essas duas medidas permitem a determinação do nível de impurezas na cana (por exemplo, Brix menos Pol é igual ao total de impurezas na cana). Além

disso, essas medidas permitem estimar o teor de açúcar da cana madura (Mackintosh, 2000).

b) Subprodutos da cana

Bagaço é a porção fibrosa da cana que continua depois que o suco é extraído. Ele tem várias aplicações, incluindo geração de energia, produção de papel e alimentação animal. É constituído por dois tipos de fibras, que constituem 55% do seu peso seco. São elas: a celulose da casca e a medula. As fibras de celulose são longas e são úteis na produção de papel. Já a medula é considerada como contaminante para a produção de papel de alta qualidade (Allen *et al.*, 1997).

O bagaço é também usado como alimentação animal, contudo possui limitações devido a sua baixa digestibilidade até para os ruminantes (cerca de 25%) (De Medeiros e Machado, 1993; UM Industrial Development Organisation, 2002). Tratamentos químicos e biológicos melhoram a digestibilidade em aproximadamente 65% (Playne, 1984; Allen *et al.*, 1997).

O melaço, também chamado de mel esgotado, do qual não se extrai mais açúcar, por razões econômicas, é oriundo do suco clarificado, sendo utilizado para fermentação alcoólica, para suplementos de alimentação, além de servir como fertilizante para os campos de plantação (Sansoucy *et al.*, 1988; Mackintosh, 2000).

3.3. Melhoramento e Biotecnologia em Cana-de-Açúcar

Os cultivares híbridos comerciais derivam do cruzamento básico que envolve a combinação do vigor, resistência a doenças de *S. spontaneum* e o alto teor de açúcar de *S. officinarum* (Bull and Glasziou, 1979). O aumento do conteúdo de açúcar concomitante a manutenção da resistência a doenças nos cultivares comerciais tem sido alcançado através de retrocruzamentos de vários cultivares diferentes de *S. officinarum* (Bull and Glasziou, 1979) num processo denominado de nobilitação (Daniels and Roach, 1987). Conseqüentemente, o

conteúdo genético de *S. spontaneum* é reduzido nos híbridos comerciais. Esses híbridos comerciais possuem aproximadamente 80% de cromossomos derivados de *S. officinarum* e 10% de *S. spontaneum*, com resíduo cromossomal produzido pelo processo natural de sinapses durante a meiose (D'Hont *et al.*, 1996).

A biotecnologia oferece oportunidades excelentes para o melhoramento da cana-de-açúcar. A cana comercial, devido ao seu genoma complexo poliplóide-aneuplóide, base genética estreita, suscetibilidade de várias doenças e um longo tempo de melhoramento convencional (12-15 anos), pode se beneficiar das técnicas biotecnológicas. Na África do Sul, o período para o lançamento de uma nova variedade é de cerca de 14 anos, em decorrência dos inúmeros processos de cruzamentos e seleção, além de avaliações em vários locais e anos (Barnes *et al.*, 1997). No Brasil, este período foi reduzido para cerca de 12 anos, através do programa de melhoramento do CTC.

Embora a pesquisa biotecnológica em cana-de-açúcar tenha começado em 1960 com experimentos de regeneração de planta *in vitro* (Nickell, 1964; Heinz and Mee, 1969), avanços importantes para melhorar essa cultura através de abordagens moleculares começaram apenas na década passada. O estabelecimento de um sistema de transformação eficiente por Bower and Birch (1992) foi uma grande realização por integrar técnicas moleculares e convencionais. Continuando esse processo, tentativas têm sido direcionadas para melhorar características agrônomicamente úteis em vários genótipos cultivados. (Gallo-Meagher and Irvine, 1996; Smith *et al.*, 1996; Allsopp and Manners, 1997; Arencibia *et al.*, 1997; Enriquez-Obregon *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 1999; Setamou *et al.*, 2002; Manickavasagam *et al.*, 2004; Vickers *et al.*, 2005a, 2005 b).

A transformação por microprojéteis (Bower and Birch, 1992), por eletroporação (Rathus and Birch, 1992) e por *Agrobacterium* (Enriquez-Obregon *et al.*, 1998), foi relatada para o desenvolvimento de cana transgênica com resistência a patógenos microbianos como o vírus mosaico (SCMV) (Joyce *et al.*, 1998a, 1998 b) e a pragas como a lagarta da cana (Allsopp and Suasard, 2000), bem como cana com características úteis como resistência a herbicidas (Leibbrandt and

Snyman, 2003). Além de estudos para aumentar o acúmulo de açúcar (Ma *et al.*, 2000; Silva and Bressiani, 2005).

Para um programa de melhoramento ser bem sucedido é essencial conhecer as bases genéticas das variações fenotípicas, se descritas em termos de características agrônômicas convencionais ou modelos de introgressão de características. Avanço genético pode ser alcançado a partir do momento em que exista variabilidade genética e que o efeito ambiental não mascare por completo esta variabilidade, e que a seleção e recombinação de genótipos superiores possam ser realizadas para se estabelecer a próxima geração (Ferreira and Grattapaglia, 1998).

Em resumo, pesquisas biotecnológicas no melhoramento da cana têm sido realizadas nas áreas de: (1) cultura de tecidos para investigação molecular e propagação; (2) engenharia de novos genes em cultivares comerciais; (3) diagnósticos moleculares para patógenos para melhoria nas trocas genéticas de germoplasmas de *Saccharum* e de gêneros relacionados como *Miscanthus* e *Erianthus*; (4) desenvolvimento de mapas genéticos usando marcadores moleculares; (5) compreensão da base molecular do acúmulo de sacarose (Lakshmanan, 2005).

A tendência geral do melhoramento genético de plantas é a integração das técnicas clássicas com aquelas mais modernas da biotecnologia, levando-se em consideração as vantagens e limitações de cada uma delas. Nessa ótica, os marcadores moleculares podem contribuir significativamente para o conhecimento básico da cultura e do caráter estudado, e para a geração de produtos melhorados.

3.4. Marcadores Moleculares em Vegetais

As limitações decorrentes do uso de marcadores morfológicos, fisiológicos e citológicos, para acessar a diversidade genética em cultivares e em espécies vegetais selvagens têm sido ultrapassadas pelo desenvolvimento de marcadores de DNA, que possibilitou a construção de mapas de ligação para boa parte das

plantas cultivadas, facilitando o entendimento da base genética de caracteres quantitativos (Ferreira and Grattapaglia, 1998).

Os principais marcadores baseados em DNA são: RFLP – *Restriction Fragment Length Polymorphism* (polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição) (Botstein *et al.*, 1980); RAPD – *Random Amplified Polymorphic DNA* (polimorfismo de DNA amplificado ao acaso) (Williams *et al.*, 1990); AFLP – *Amplified Fragment Length Polymorphism* (polimorfismo de comprimento de fragmento amplificado) (Zabeau and Vos, 1993); SSR – *Simple Sequence Repeats* (seqüências simples repetidas - Tautz, 1989). Todavia, esses marcadores moleculares apresentam várias diferenças em termos de custo, velocidade, quantidade de DNA necessária, trabalho técnico, nível de polimorfismo, precisão da distância genética estimada e o alcance estatístico dos testes (Aitken *et al.*, 2006).

O polimorfismo de RFLP é evidenciado pela fragmentação do DNA através do uso de enzimas de restrição e observado por hibridização destes fragmentos com seqüências homólogas de DNA marcadas com radioatividade ou compostos que desencadeiam uma reação de luminescência (Ferreira e Grattapaglia, 1998). Embora o poder de discriminação do RFLP nos estudos de diversidade seja bem documentado (Smith *et al.*, 1990; Dudley *et al.*, 1991; Benchimol *et al.*, 2000), as limitações relacionadas à rotina do uso de RFLP estimularam estudos com outros tipos de marcadores moleculares tais como RAPD, que será comentado adiante, visto que é mais simples de usar e não necessita de materiais radioativos (Williams *et al.*, 1990).

O grande avanço na área de marcadores moleculares baseados em PCR ocorreu em 1990, com a idéia de se utilizar iniciadores mais curtos e de seqüência arbitrária para dirigir a reação de amplificação, eliminando assim a necessidade do conhecimento prévio de seqüência.

O RAPD surgiu nessa época, e utiliza um iniciador único ao invés de um par de iniciadores, com seqüência arbitrária, sendo sua seqüência alvo desconhecida (Ferreira and Grattapaglia, 1998). Desde sua descrição, o uso de marcadores RAPD na análise genética e no melhoramento de plantas teve uma difusão

extremamente rápida. O RAPD é bem aplicado para impressão digital de DNA (Dos Santos *et al.*, 1994; Thormann *et al.*, 1994), embora não possua uma boa reprodutibilidade devido a anelamentos errôneos (Neale and Harry, 1994; Demeke *et al.*, 1997).

Microssatélites (SSRs) ocorrem freqüentemente na maioria dos eucariotos e pode ser muito informativo, multialélico e reprodutível (Vos *et al.*, 1995; Senior and Heun, 1993) muitas vezes superando as limitações do RFLP e RAPD. Os SSRs são seqüências repetitivas, com motivos de 2-6 pb (Litt and Luty, 1989). As diferenças de tamanho presentes nos *loci* de microssatélites rapidamente os tornaram marcadores atrativos para uma variedade de aplicações incluindo a construção de mapas genéticos de alta-densidade, análises parentais e estudos evolucionários. Além do curto tamanho, essas repetições apresentam regiões flangeadoras em geral muito conservadas, o que possibilita a construção de iniciadores, permitindo a amplificação via PCR (Ferreira and Grattapaglia, 1998).

A aplicação da técnica SSR em plantas depende da disponibilidade de marcadores adequados, que têm sido desenvolvidos para espécies como soja (Rongwen *et al.*, 1995), arroz (Zhao and Rochert, 1993), milho (Taramino and Tingey, 1996), feijão comum (Yu *et al.*, 2000), e cana-de-açúcar (Cordeiro *et al.*, 2000). Com destaque para Souza (2003) que detectou polimorfismos em cana, usando iniciadores SSR em uma progênie resultante do cruzamento de clones elite de SP80-180 e SP80-4966, também utilizada neste trabalho.

A técnica de AFLP, que será detalhada mais adiante, é mais trabalhosa e consome mais tempo que RAPD, contudo é mais confiável. AFLP detecta um grande número de bandas polimórficas, com alto nível de polimorfismo. Embora a baixa sensibilidade em detectar classes genóticas informativas esteja associada com a incapacidade para distinguir heterozigotos de homozigotos, Gerber *et al.* (2000) sugeriram que o alto número de *loci* polimórficos revelados pelo AFLP contrabalança a perda de informação resultante da dominância. É também sabido que a técnica de AFLP tem custo inicial baixo e é mais transferível entre as espécies que o método SSR (Gerber *et al.*, 2000). Técnicas baseadas em AFLP têm sido aplicadas no mapeamento genético (Zimnoch-Guzowska *et al.*, 2000;

Katengam *et al.*, 2002; Strommer *et al.*, 2002; Kido, 2003), DNA *fingerprinting* (Powell *et al.*, 1996), estudos de diversidade genética (Russell *et al.*, 1997), análise parental (Gerber *et al.*, 2000; Lima *et al.*, 2002), análise de características quantitativas (Hoffman and Dahleen 2002; Salland *et al.*, 2003; Aitken *et al.*, 2006).

Os marcadores AFLP também têm apresentado bons resultados para outras aplicações, como caracterização da variação somaclonal decorrente da cultura de tecidos e órgãos vegetais (Popescu *et al.*, 2002), identificação de mutantes (Scott *et al.*, 2000) e análise de quimeras (Franks *et al.*, 2002), ratificando a utilidade dessa ferramenta na análise genética.

O uso dos diversos tipos de marcadores moleculares proporciona cobertura mais rápida do genoma, avaliação de germoplasmas, mapeamento genético, seleção indireta e/ou precoce de genótipos superiores.

Um mapa genético de alta densidade do genoma de sorgo foi construído por Menz *et al.* (2002), utilizando marcadores AFLP, RFLP e SSR. No geral, os marcadores AFLP preencheram a maioria das lacunas deixadas pelos RFLP e SSR, demonstrando que a tecnologia AFLP é eficiente em alcançar todo o genoma.

Um estudo realizado com milho em 2004 por Garcia *et al.* comparou a eficiência dos marcadores RAPD, RFLP, AFLP e SSR na inferência da diversidade genética do milho. Os resultados mostraram que os marcadores AFLP apresentaram alta acurácia na avaliação de diversidade e na informação genética das relações entre as linhagens de milho estudadas.

Oliveira *et al.* (2005) aplicou a técnica de AFLP para estudar a diversidade genética de cultivares de videira e identificar marcadores associados à resistência ao míldio e ao oídio, ambas doenças fúngicas. Os agrupamentos gerados pelos marcadores AFLP corresponderam à classificação botânica dos cultivares. Foram ainda identificadas 15 marcas para resistência/suscetibilidade, sendo oito para míldio e sete para oídio, coincidentes com a avaliação fenotípica em estudo.

Kido (2003) mapeou marcadores AFLP em população oriunda de clones elite de cana-de-açúcar (genitores 'SP80-180 e SP80-4966'), e também fez uma associação desses marcadores com caracteres agrônômicos de interesse,

identificando alguns marcadores promissores que serviram de base para este trabalho. Garcia *et al.* (2006), compilando estes marcadores AFLP e outros (SSR e RFLP), produziram um mapa para cana-de-açúcar com 357 marcadores ligados, sendo 57 RFLPs, 64 SSRs e 236 AFLPs que determinaram 131 grupos de co-segregação.

A análise molecular via marcadores já beneficia tremendamente o melhoramento de plantas, com a perspectiva ainda de grandes progressos, aliando tecnologias economicamente acessíveis e de fácil manipulação.

3.5. A Técnica de AFLP

Polimorfismo de comprimento de fragmento amplificado (AFLP) é uma técnica molecular para impressão de DNA de qualquer origem e complexidade. Possui um grande número de aplicações potenciais, tais como o monitoramento da herança de características agrônômicas em plantas e animais, diagnóstico de doenças genéticas, análises de *pedigree*, análise forense, análise parental, *screening* de marcadores de DNA ligados a características genéticas (Bleas *et al.*, 1998).

A técnica de AFLP tem várias vantagens sobre outros sistemas de impressão de DNA, sendo a mais importante delas a capacidade de examinar um genoma completo em relação aos seus polimorfismos, além de sua reprodutibilidade. Ela pode ser aplicada a qualquer amostra de DNA, incluindo humano, animal, vegetal e microorganismos, conferindo-lhe o potencial de se tornar um sistema universal de impressão de DNA (Bleas *et al.*, 1998).

A técnica foi desenvolvida por Zabeau e Vos, em 1993, e patenteada pela Keygene NV (Wageningen, The Netherlands). No AFLP, os polimorfismos genéticos são identificados no gel pela presença ou ausência de fragmentos de DNA, após a digestão e amplificação do DNA genômico.

As quatro etapas básicas do AFLP consistem em: (1) digestão do DNA genômico; (2) ligação de adaptadores; (3) amplificação; (4) análise dos fragmentos, através de gel.

(1) Digestão do DNA genômico

Fragmentos de restrição são gerados com o auxílio de duas endonucleases, uma de corte raro com 6- 8 bases de reconhecimento, e outra de corte freqüente com sítio de restrição de 4 bases. O alto nível de especificidade dessas enzimas resulta na produção de um conjunto reprodutível de fragmentos de DNA. Além disso, a complexidade do genoma e fatores como nível de metilação do DNA influenciam a especificidade de certas enzimas (Bachem *et al.*,1996).

O uso de duas enzimas diferentes permite aos pesquisadores manipularem o número de fragmentos gerados para amplificação, produzindo padrões de impressão com a desejada complexidade. Três tipos de fragmentos de restrição são gerados, logo após a digestão. São eles (i) fragmentos cortados por enzimas de corte raro nas duas extremidades; (ii) fragmentos cortados em ambas extremidades por enzimas de corte freqüente; (iii) fragmentos cortados numa extremidade por enzima de corte raro e na outra por enzima de corte freqüente. Usando como exemplo, as enzimas *EcoRI* e *MseI*, poderíamos produzir fragmentos cortados por *EcoRI-EcoRI*, *EcoRI-MseI* e por *MseI-MseI*. Estima-se que mais de 90% dos fragmentos possuem cortes freqüentes nas duas extremidades (Bachem *et al.*,1996).

(2) Ligaçãõ dos Adaptadores

A técnica de AFLP não depende do conhecimento da seqüência de DNA. Nucleotídeos complementares (10-30 pb) às extremidades cortadas são ligados às mesmas usando a T4 DNA ligase. A seqüência de adaptadores e o sítio de restrição adjacente servem como sítios de ligação para iniciadores das subseqüentes amplificações.

A ligação não restaura o sítio original da enzima devido à incorporação de uma base na seqüência do adaptador. Essa mudança no sítio de reconhecimento impede que uma nova restrição ocorra depois que a ligação tenha sido realizada, permitindo que a restrição e a ligação aconteçam num mesmo tubo. Além disso, a

ligação entre adaptadores é evitada pelo uso de adaptadores não fosforilados (Blears *et al.*, 1998).

(3) Amplificação Seletiva

Iniciadores AFLP para amplificação seletiva contêm três tipos de seqüências de DNA: a região 5' complementar ao adaptador, a seqüência do sítio de restrição e os nucleotídeos seletivos na região 3'. Dois iniciadores de AFLP são usados; um é complementar ao adaptador e a região de corte raro, com um a três nucleotídeos adicionais na região 3'; e o outro iniciador é complementar ao adaptador e a região de corte freqüente, com um a três nucleotídeos adicionais na região 3' (Blears *et al.*, 1998).

Após a reação de restrição e ligação, um limitado número de fragmentos é amplificado seletivamente por iniciadores AFLP. Apenas um subconjunto de fragmentos moldes, com nucleotídeos complementares além do sítio de restrição será amplificado sob condições estringentes de anelamento. As extensões nucleotídicas na extremidade 3' dos iniciadores servem a dois propósitos:

(i) elas permitem que uma variedade de subconjuntos dos fragmentos de restrição seja amplificada;

(ii) elas fornecem possibilidades adicionais para que os polimorfismos sejam detectados além do sítio de restrição.

Embora os fragmentos cortados apenas por enzimas de corte freqüente (ex: *MseI*- *MseI*) sejam predominantes nas espécies (> 90%), fragmentos cortados por ambas enzimas de corte raro e freqüente (ex: *EcoRI*- *MseI*) são preferencialmente amplificados. Há duas razões para essa eficiência: (i) o iniciador complementar ao sítio de restrição de corte raro e ao adaptador possui uma temperatura de anelamento maior que o iniciador de corte freqüente; (ii) fragmentos cortados por ambas as enzimas (ex: *EcoRI*- *MseI*) são amplificados usando dois iniciadores (ex: *EcoRI*- *MseI* iniciadores) evitando a formação de repetições invertidas nas extremidades (Vos *et al.*, 1995).

O número de fragmentos amplificados é determinado pela complexidade do DNA genômico, pela escolha das enzimas, como também pelo número e tipo de

nucleotídeos seletivos nos iniciadores de PCR. Há quase uma correlação linear entre o número de fragmentos amplificado e tamanho do genoma. Como o número de nucleotídeos seletivos é aumentado, a complexidade do padrão de bandas do DNA decresce. O número de fragmentos amplificados é reduzido aproximadamente de quatro vezes, a cada base seletiva adicionada (Vos *et al.*, 1995).

Embora não haja nenhuma metodologia padrão para a escolha dos nucleotídeos seletivos, extensões nucleotídicas compostas de 2 ou 3 nucleotídeos reduzem enormemente o número de fragmentos amplificados. O tamanho e a natureza da extensão de bases na extremidade 3' dos iniciadores podem ser manipulados para gerar impressões digitais com a complexidade desejada.

Para genomas pequenos de 10^6 - 10^7 pares de bases (pb), 1 a 2 nucleotídeos seletivos na extremidade 3' de cada iniciador pode ser suficiente para revelar o polimorfismo. Genomas mais complexos (de 10^8 – 10^9 pb) necessitam de mais bases seletivas para alcançar o número de fragmentos adicionais desejados. Apesar da complexidade reduzir quando cada base seletiva é adicionada, a seletividade é mantida com no máximo três bases seletivas. Vos *et al.* (1995) demonstraram que a seletividade é perdida quando se usa quatro bases para extensão.

Uma estratégia de se utilizar duas etapas de amplificação foi desenvolvida para genomas complexos (10^8 - 10^9), para isso necessita-se de três nucleotídeos seletivos em um ou ambos iniciadores. A primeira amplificação, chamada de pré-amplificação, utiliza iniciadores que têm um ou nenhum nucleotídeo seletivo. Os produtos de PCR dessa pré-amplificação são diluídos e usados como moldes para uma segunda reação de amplificação, agora com três nucleotídeos seletivos, chamada de amplificação seletiva. A inclusão da pré-amplificação reduz os arrastos de fundo no padrão de bandas, causados por amplificações errôneas (Vos *et al.*, 1995).

(4) Análise dos fragmentos em gel

Antes de separar os fragmentos amplificados em gel de poliacrilamida, as amostras são desnaturadas por aquecimento a 95 °C por 5 min, a fim de prevenir a ocorrência de bandas duplas no gel devido à mobilidade desigual das duas fitas. Duas técnicas de marcação são comumente empregadas, tanto por marcação radioativa ou por corante fluorescente. Normalmente, o iniciador correspondente a enzima de corte raro é marcado por fosforilação na extremidade 5' com γ -³²P ou γ -³³P, usando a T4 kinase. Os fragmentos são então separados em gel de poliacrilamida de 5% a 7%; padrões típicos de AFLP são visualizados por autoradiografia, ou por coloração com prata que não necessita de marcação (Blears *et al.*, 1998).

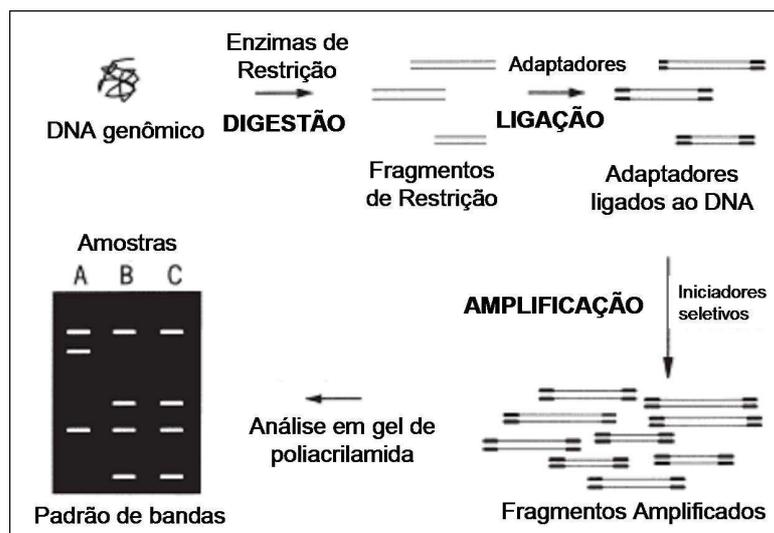


Figura 2: Esquema adaptado que resume as quatro etapas do AFLP
 Fonte: Blears *et al.*, 1998.

3.5.1. Fatores que Afetam a Reprodutibilidade do AFLP

DNA de alta pureza é necessário para o AFLP, para assegurar a completa digestão pelas endonucleases de restrição. Restrição incompleta do DNA gera fragmentos parciais, predominantemente de alto peso molecular. O padrão desses fragmentos altera o perfil de bandas, e podem ser interpretadas como falsos polimorfismos. Embora o AFLP seja afetado pela qualidade do DNA, ele é insensível à concentração de DNA molde (Vos *et al.*, 1995).

3.5.2. Vantagens do AFLP

A técnica de AFLP pode ser usada para amostras de DNA de qualquer origem ou complexidade. Pequenas variações nas seqüências podem ser detectadas usando apenas quantidades pequenas de DNA genômico (0,05-0,5 µg). A capacidade de revelar muitas bandas polimórficas é uma das grandes vantagens desse marcador. Um grande número de bandas é analisado simultaneamente, fazendo do AFLP uma técnica extremamente eficiente. AFLP tem a capacidade de analisar um grande número de *loci* por polimorfismo, mais do que qualquer outra técnica disponível baseada em PCR (Blears *et al.*, 1998). AFLP é superior em termos de números de seqüências amplificadas por reação e por sua reprodutibilidade. Os marcadores produzidos estão disponíveis e são reproduzidos, dentro e entre, os laboratórios, sendo relativamente fáceis e baratos de gerar.

3.5.3. Coloração com Prata

A coloração com prata foi originalmente descrita para detecção ultrasensível de polipeptídios, separados por eletroforese em gel de poliacrilamida (Merril *et al.*, 1981), e posteriormente adaptada para detecção de ácidos nucléicos (Sommerville and Wang, 1981; Herring *et al.*, 1982; Blum *et al.*, 1987). Beidler *et al.* (1982) desenvolveram um método fotoquímico para a detecção de ácidos nucléicos com o aumento da sensibilidade. Desde então, várias pequenas adaptações do método original têm sido propostas para melhorar a sensibilidade,

reduzir as etapas do processo e eliminar componentes tóxicos da coloração, permitindo também uma melhor visualização dos fragmentos (Bassam *et al.*, 1991; Santos *et al.*, 1993; Sanguinetti *et al.*, 1994).

Creste *et al.* (2000) realizaram um estudo para avaliar um método de baixo custo de coloração com prata, adaptado de Beidler *et al.* (1982), utilizando como modelo a banana (*Musa spp.*). Foram comparados também outros dois métodos de coloração modificados (Bassam *et al.*, 1991; Sanguinetti *et al.*, 1994), sendo otimizada as condições para a detecção de SSR usando gel de poliacrilamida desnaturante. Os métodos de coloração comparados diferiram quanto à sensibilidade e contraste, sendo o melhor método aquele baseado em Beidler *et al.* (1982), por ter dados resultados satisfatórios sem os riscos associados ao uso de radioisótopos. Esse método foi adotado rotineiramente por Creste *et al.* (2000) para análises de AFLP e SSR em várias culturas tropicais, como cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*), cacau (*Theobroma cacao*), cana-de-açúcar (*Saccharum spp*), feijão comum, maçã e citrus.

Nurmi *et al.* (2000) utilizaram a metodologia de AFLP através da coloração com prata para diferenciar linhagens de fungos de um mesmo gênero, em que observaram diferenças razoáveis entre as linhagens estudadas.

Briard *et al.* (2000) compararam a coloração com prata e a metodologia radioativa, para analisar marcadores AFLP em cenoura. Os resultados da visualização de bandas foram considerados razoáveis para as duas metodologias, sendo que o método radioativo mostra ainda uma maior sensibilidade, uma vez que na coloração com prata muitas bandas falharam. A visualização com prata em gel de poliacrilamida foi uma alternativa útil ao método radioativo, mesmo que algumas vezes a sensibilidade da coloração por prata tenha sido menor.

O método de coloração com prata foi previamente aplicado para análise do bandejamento padrão de DNA (Bassam *et al.*, 1991). A técnica de AFLP por coloração com prata apresenta a vantagem de recuperação menos laboriosa dos fragmentos do gel poliacrilamida seco, através de uma simples re-hidratação e transferência direta para tubo de PCR. Os fragmentos recuperados servem para posterior caracterização por clonagem, seqüenciamento e preparação de sondas

(Cho *et al.*, 1996; Chalhoub *et al.*, 1997). Enquanto que no método radioativo, a recuperação de fragmentos é mais complexa, pois necessita de transferências do gel de poliacrilamida para papel filtro e filme em ausência de luz, sendo necessário o realinhamento dos fragmentos para a excisão (Bradeen and Simon, 1998; Santos and Simon, 2002).

3.6. Associação Fenótipo-marcador e Detecção de QTL em Cana-de-açúcar

A maioria das características quantitativas herdáveis de importância econômica resulta da ação conjunta de vários genes. Estas características são denominadas poligênicas, quantitativas ou de herança complexa, sendo poucas informações existentes sobre o número, posição cromossômica, magnitude do efeito e interações dos locos que controlam a expressão das mesmas. Estes locos são denominados de QTL- *Quantitative Trait Loci*- locos controladores de característica quantitativa (Ferreira and Grattapaglia, 1998).

Antes que a correlação entre um ou mais marcadores moleculares e locos genéticos que controlam características de interesse agrônomico seja estabelecida, a disponibilidade de uma bateria de marcadores moleculares, por si só, já permite uma série de estudos importantes, dentro de um programa de melhoramento, como citamos anteriormente, através da identificação e discriminação de genótipos, além da análise da variabilidade genética (Ferreira and Grattapaglia, 1998).

A capacidade de detectar um QTL é uma função da magnitude do seu efeito sobre a característica, do tamanho da população segregante avaliada, da frequência de recombinação entre o marcador e QTL, bem como da herdabilidade da característica (Ferreira and Grattapaglia, 1998). Evidentemente, quanto maior o efeito, o tamanho da população, a herdabilidade e a proximidade do marcador ao QTL, mais fácil será a detecção. Fenótipos complexos são caracteres com baixa herdabilidade, altamente influenciados pelo ambiente, ou de difícil avaliação (Ferreira and Grattapaglia, 1998; Guimarães, 1999; Andrade, 2005).

A determinação de ligação genética entre marcadores e QTLs depende da existência do desequilíbrio de ligação, que é definido como sendo qualquer desvio

das frequências alélicas em relação às frequências esperadas sob independência, indicando a existência de uma associação entre dois locos, que pode ser detectada e estimada através de análises estatísticas adequadas (Yin *et al.*, 2003).

As bases das detecções de QTLs são as análises estatísticas das associações fenótipo – marcador, isto é, entre os marcadores e as características avaliadas (Yin *et al.*, 2003), ficando a critério do pesquisador o estabelecimento do nível de significância apropriado para a classificação da associação fenótipo – marcador em possível QTL.

A detecção e mapeamento de genes, associados a caracteres quantitativos, têm sido realizadas em um expressivo número de culturas, usando-se os mais diversos métodos, como a análise de marcas simples ou individuais (Wu *et al.*, 1992), com realizações de análises da variância e de regressão linear e o mapeamento por intervalo (Lander and Botstein, 1989). Regressões lineares aplicadas para cada marcador em relação às características quantitativas, com resultados estatisticamente significativos, indicariam ligações genéticas (Lander and Botstein, 1989). Se um determinado marcador de fácil identificação fenotípica estiver fisicamente ligado à pequena distância de um gene que controla um caráter de interesse agrônômico, a seleção deste marcador resulta na seleção indireta do gene de interesse (Ferreira and Grattapaglia, 1998).

A eficiência deste processo de seleção indireta, baseado na segregação conjunta do marcador e do gene, é uma função da distância entre os dois expressa em probabilidade de recombinação genética. Em geral, a maioria dos caracteres de importância econômica, principalmente aqueles relacionados com produtividade, possuem herança quantitativa (Ferreira and Grattapaglia, 1998).

A poliploidia ainda constitui um desafio para análises genéticas de características agrônômicas com o uso de marcadores moleculares em cana-de-açúcar, mais do que em outras culturas. Apesar do desenvolvimento de uma teoria específica para detecção de QTLs em poliplóides, que se baseia na construção de todas as possíveis configurações cromossômicas que podem resultar num gameta

(Doerg and Craig, 2000), ainda não existem ferramentas disponíveis para uma investigação sistemática, principalmente quando há grandes discrepâncias de marcadores entre cromossomos homólogos; e quando o número de cromossomos homólogos é variável com pareamentos irregulares, tais quais observados no genoma da cana cultivada. A abordagem mais viável continua sendo a investigação de QTLs individualmente em cada cromossomo, levando em consideração a perspectiva de que marcadores em dose simples são muito mais úteis (Wu *et al.*, 1992; Hoarau *et al.*, 2002).

Apesar de algumas limitações do estudo de QTLs, mesmo com progênies relativamente pequenas (Sills *et al.*, 1995; Guimarães, 1999), um número significativo de associações entre marcadores e QTLs tem sido detectado (Ming *et al.*, 2001; Hoarau *et al.*, 2001, 2002; Aitken *et al.*, 2006). É importante lembrar que um QTL pode na verdade ser constituído por vários genes que funcionam em conjunto (Ferreira and Grattapaglia, 1998).

A genotipagem seletiva (“*selective genotyping*”) proposta por Lander and Botstein (1989), cujo princípio já tinha sido descrito por Stuber *et al.* (1980), baseia-se no fato de que uma diferença significativa na frequência alélica nos QTLs, nos extremos alto e baixo de uma distribuição fenotípica, pode ser utilizada para um teste de ligação entre marcador e QTL.

A utilização de marcadores moleculares em programas de introgressão via retrocruzamento é talvez a aplicação mais concreta atualmente da tecnologia de marcadores no melhoramento. Marcadores moleculares fortemente ligados aos genes que se deseja introgridir são utilizados para monitorar a sua presença nas gerações de retrocruzamento (Ferreira and Grattapaglia, 1998; Andrade, 2005).

A seleção assistida por marcadores (*Marker Assisted Selection* - MAS) se torna possível, se as características de interesse estiverem sob o controle de genes identificados ou dos *loci* de caracteres quantitativos detectados (Ribaut and Hosington, 1998). O sucesso da MAS para o melhoramento de plantas advém da identificação de ligação dos marcadores aos QTLs e de seus efeitos sobre o caráter (Barnes *et al.*, 1997; Ferreira and Grattapaglia, 1998)

Zhang *et al.* (2003) identificaram nove marcadores moleculares, sendo três do tipo SSR e seis do tipo RAPD ligados a dois QTLs de fibras no algodão (*Gossypium anomalum*). Esses marcadores podem ser úteis no aumento da resistência da fibra em cultivares comerciais.

QTLs relacionados com estresse abiótico em cevada, organismo hexaplóide, gerados por marcadores AFLP, RFLP, SSR e SNP, foram identificados por Rostoks *et al.* (2005). Detecção de QTLs também tem sido realizada em organismos tetraplóides como a batata, para verificar associações com características ligadas à resistência a doenças (Bradshaw *et al.*, 1998).

Em 2006, D'Hont *et al.* construíram mapas genéticos em cana-de-açúcar que geraram 1.666 marcadores polimórficos, usando 37 combinações de *iniciadores* de AFLP, 46 de SSRs e nove sondas de RFLP. Dois novos genes que controlam características mendelianas foram encontrados em um dos parentais: um gene que controla a cor vermelha no caule estava ligado a 6,5 cM de um marcador AFLP, e um gene de resistência à ferrugem estava ligado a 23 cM também de um marcador AFLP.

Associações fenótipo-marcadores no trigo foram identificadas por Gupta *et al.* (2006), ao analisar 14 caracteres de interesse agronômico (dentre eles nível de qualidade, resistência a estresse biótico e abiótico) usando 20 pares de *iniciadores* SSR, 8 AFLP e 2 SAMPL (*Selective Amplifications of Microsatellite Polymorphic Loci*). Um total de 131 SSR, 43 SAMPL e 166 AFLP marcadores tiveram associação significativa com no mínimo um caráter, através das abordagens de regressão linear e de múltipla regressão. Associações de pouco mais de 50 marcadores AFLP também foram detectadas em algodão relacionadas com sete caracteres agronômicos (Wu *et al.*, 2007).

A metodologia de análise de marca simples (Wu *et al.*, 1992) para poliplóides é uma alternativa para simplificar o estudo das segregações de múltiplos alelos em diferentes dosagens, visto que a identificação dos genótipos através dos fenótipos das bandas não é possível. Um marcador em dose simples (simplex) corresponderia ao alelo em autopoliplóides ou a um alelo em um loco heterozigoto em um genoma diplóide. Sua segregação seria equivalente a

segregação de um simplex ou de um alelo heterozigoto nos gametas: metade dos quais iria conter o DNA para o fragmento e a outra metade não. Esses gametas seriam visualizados na progênie de cruzamentos, envolvendo genitor portador do fragmento com genitor não portador, segregando 1:1 (Wu *et al.*, 1992).

Mapeamentos de marcadores em doses simples permitiram construir mapas para cana-de-açúcar (Ming *et al.*, 2002). O primeiro mapa baseou-se em 88 F1 de uma progênie de *S. spontaneum* 'SES 208' ($2n = 64$) e seu duplo haplóide ADP068, com marcadores RAPDs (Al-Janabi *et al.*, 1993). De 279 polimorfismos obtidos com 127 iniciadores, 208 (74,6%) locos simplexes compuseram 42 grupos de ligação, os quais totalizaram 1500 cM, cobrindo 85,1% do genoma previsto.

A realização de análises de variância e/ou análises de regressão linear, juntamente com a análise de marca simples, visando detectar uma associação significativa entre um caráter e um dado marcador, tem sido aplicada na detecção de QTLs em cana-de-açúcar (Guimarães, 1999; Ming *et al.*, 2001, 2002; Hoarau *et al.*, 2002; Kido, 2003; Andrade, 2005), bem como estudos de QTL's relacionados com características de produção (Hoarau *et al.*, 2002) e acúmulo de sacarose (Silva and Bressiani, 2005).

O trabalho de Silva and Bressiani, em 2005, com clones elite de cana-de-açúcar (genitores 'SP80-180' e SP80-4966'), apresentou um marcador RFLP, dose simples, derivado de uma etiqueta de seqüência expressa (EST) da sacarose sintetase associado com conteúdo de açúcar, eles classificaram essa associação como um QTL putativo a nível de 1%, sendo necessária a validação desse QTL em outros cruzamentos.

Kido (2003) utilizou análises de marca simples para detecção de QTLs a partir de marcadores AFLP obtidos para a progênie do Programa de Melhoramento Genético da COPERSUCAR, advinda de genitores considerados elites ('SP80-180' e SP80-4966'). Detectaram-se marcadores em associação com caracteres de importância agrônômica – altura e diâmetro de colmo, número de perfilhos, teor de Brix no caldo, POL% na cana (PCC), percentual de fibras e

produtividade (TCH) em tonelagem de cana por hectare – avaliados em ensaios de produção envolvendo os estádios de cana-planta e cana-soca, conduzidos em dois anos consecutivos (2000/2001). Em relação ao percentual de fibras, independente do ciclo avaliado, 14 associações (fibra - marcador) significativas ($p < 0,005$) foram consideradas QTLs. Para POL% na cana (PCC), foram encontradas 17 associações significativas ao nível estudado. Quanto ao caráter produtividade (TCH), 13 associações foram encontradas. Os QTLs mais confiáveis são aqueles que mostram uma expressão consistente em múltiplos ambientes e que, paralelamente, apresentem estabilidade entre os anos (Conner *et al.*, 1998).

O prosseguimento desses estudos, a partir de dados de novos ensaios, envolvendo a progênie acima e os marcadores obtidos, bem como outros novos marcadores, possibilitará avaliar a estabilidade dos QTLs em ambientes diversos e em diferentes anos, a partir da comparação de novas análises de QTLs com aquelas realizadas pelo autor citado, permitindo identificar marcadores potenciais para uso futuro em seleção assistida.

3.7. Interação QTLs x Ambientes

A interação genótipo x ambiente ocorre quando dois ou mais genótipos apresentam desempenho diferenciado em ambientes distintos, o que é descrito como sensibilidade genotípica diferencial aos ambientes (Falconer and Mackay, 1996). Com o aumento da disponibilidade de marcadores e a perspectiva do uso das informações em programas de seleção assistida, fez-se necessário a verificação da presença de interações QTL x ambiente, para várias culturas e caracteres de interesse. Assim consideram-se como fatores relacionados ao ambiente, locais de avaliação, anos agrícolas, épocas de plantio num mesmo ano, condições contrastantes dentro do mesmo experimento (Rumin, 2005).

A presença de interação QTL x ambiente foi detectada pela inconsistência na detecção de QTLs em ambientes distintos, bem como pela variação de seus efeitos. Num programa de melhoramento de plantas, busca-se selecionar genótipos com desempenho estável em diversos ambientes. Estudos conduzidos

em ambientes contrastantes para vários caracteres agronômicos sugerem que conjuntos diferenciados de alelos e, possivelmente, locos diferentes, são responsáveis pela expressão dos mesmos em condições ambientais distintas. Dessa forma, é extremamente desejável num programa de seleção assistida por marcadores a identificação de QTLs consistentes ao longo dos ambientes (Veldboom and Lee, 1996).

Uma maneira inovadora de identificar a interação QTL x ambiente e, posteriormente, desenvolver variedades melhor adaptadas aos ambientes por meio de seleção assistida por marcadores foi proposta por Steele *et al.* (2004). Indivíduos oriundos de uma população segregante de arroz foram avaliados em vários ambientes distintos e, com o auxílio de agricultores, selecionados os ecótipos ideais para cada região, sem inferir *a priori* qual caráter seria importante. Posteriormente, foram identificados locos relacionados a caracteres importantes para a estabilidade dos genótipos nos vários ambientes. Os autores sugerem que as regiões cromossômicas identificadas por este processo sejam utilizadas na produção de variedades de segunda geração, produzindo genótipos ideais para ambientes específicos.

A compreensão da interação genótipo e ambiente é de suma importância para a tomada de decisão sobre qual tipo de variedade é mais aplicável para determinado ambiente, influenciando assim seu melhor desempenho e estabilidade.

4. Referências Bibliográficas

Aitken KS, Jackson AP and McIntyre CL (2006) Quantitative trait loci identified for sugar related traits in a sugarcane (*Saccharum* spp.) cultivar × *Saccharum officinarum* population. *Theor Appl Genet* 20:100-112.

Al Janabi SM, Honeycutt RJ, McClelland M and Sobral BWS (1993) A genetic linkage map of *Saccharum spontaneum* L. 'SES 208'. *Genetics* 134:1249-1260.

Allen CJ, Mackay MJ, Aylward JH and Campbell JA (1997) New Technologies for Sugar Milling and By-product Modification. In Keating BA and Wilson JR (eds) *Intensive Sugarcane Production: Meeting the Challenges Beyond 2000*, CAB International, Wallingford, UK. pp 267-285.

Allsopp PG and Manners JM (1997) Novel approaches for managing pests and diseases in sugarcane. In: Keating BA and Wilson JR (eds) *Intensive sugarcane production: meeting the challenge beyond 2000*. Wallingford: CAB International; pp 173–188.

Allsopp PG and Suasa-ard W (2000) Sugarcane pest management strategies in the new millennium. *Proc Int Soc Sugar Cane Technol, Sugarcane Entomol Workshop*, Khon Kaen.

Andrade ES (2005) Associação Fenótipo-Marcador AFLP em Progenie de Clones Elite de Cana-de-açúcar (*Saccharum* spp). 2005. 60 f. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Bacharelado Em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Pernambuco.

Arencibia A, Vazquez RI, Prieto D, Tellez P, Carmona ER, Coego A, Hernandez L, De la Riva GA and Selman HG (1997) Transgenic sugarcane plants resistant to stem borer attack. *Mol Breed* 3:247–255.

Bachem CWB, van der Hoeven RS, de Bruijn SM, Vreugdenhil D, Zabeau M and Visser RGF (1996) Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: analysis of gene expression during potato tuber development. *Plant J* 9:745–753.

Bakker H (1999) *Sugarcane cultivation and management*. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 365 pp.

Barnes JM, Rutherford RS and Botha FC (1997) The identification of potential genetic markers in sugarcane varieties for the prediction of disease and pest resistance ratings. *Proc S Afr Sug Technol Ass* 7:57-61.

Bassam BJ, Caetano-Anollés G and Gresshoff PM (1991) Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Anal Biochem* 196:80-83.

Beidler JL, Hilliard PR and Rill RL (1982) Ultrasensitive staining of nucleic acids with silver. *Anal Biochem* 126:374-380

Benchimol LL, Souza Jr CL, Garcia AAF, Kono PMS, Mangolim CA, Barbosa AMM, Coelho ASG and Souza AP (2000) Genetic diversity in tropical maize inbred lines: Heterotic group assignment and hybrid performance determined by RFLP marker. *Plant Breeding* 119(6):491-496.

Besse P, McIntyre CL and Berding N (1977) Characterisation of *Erianthus* sect. *Ripidium* and *Saccharum* germplasm (Andropogoneae-Saccharine) using RFLP makers. *Euphytica* 93:283-292.

Bleas MJ, De Grandis SA, Lee H and Trevors JT (1998) Amplified fragment length polymorphism (AFLP): a review of procedure and its applications. *J Ind Micro & Biotech* 21:99–114.

Blum H, Beier H and Gross HJ (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8:93-99.

Botstein D, White RL, Skolnick M and Davis RW (1980) Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet* 32:314-331.

Bower R and Birch RG (1992) Transgenic sugarcane plants via microprojectile bombardment. *Plant J.* 2:409–416.

Bradeen JM and Simon PW (1998) Conversion of an AFLP fragment linked to the carrot Y2 locus to a simple, codominant, PCR-based marker form. *Theor Appl Genet* 97:960-967.

Bradshaw JE, Hackett CA, Meyer RC, Milbourne D, Mcnicol JW, Phillips MS and Waugh R (1998) Identification of AFLP and SSR markers associated with quantitative resistance to *Globodera pallida* (Stone) in tetraploid potato (*Solanum tuberosum* subsp. *Tuberosum*) with a view to marker-assisted selection. *Theor Appl Genet* 97:202-210.

Briard M, Le Clerc V, Grzebelus D, Senalik D and Simon WP (2000) Modified Protocols for Rapid Carrot Genomic DNA Extraction and AFLP™ Analysis using Silver Stain or Radioisotopes. *Plant Mol Biol Reporter* 18:235–241.

Bull TA and Glasziou KT (1979) Sugarcane “Australian field crops”. In Lovett JV and Lazenby A (eds) Angus and Robertson Publishers, pp 95-113.

Chalhoub BA, Thibault S, Laucou V, Rameau C, Hofte H and Cousin R (1997) Silver staining and recovery of AFLP amplification products on large denaturing polyacrylamide gels. *BioTechniques* 22:216–220.

Cho YG, Blair MW, Panaud O and McCouch SR (1996) Cloning and mapping of variety-specific rice genomic DNA sequences: amplified fragment length polymorphism (AFLP) from silver-stained polyacrylamide gels. *Genome* 39:373–378.

CONAB (2006) Companhia Nacional de Abastecimento Avaliação da Safra Agrícola de cana-de-açúcar 2006/2007 – Terceiro Levantamento – novembro/2006.

Conner PJ, Brown SK and Weeden NF (1998) Molecular Analysis of Quantitative traits for growth and development in juvenile apple trees. *Theo Appl Genet* 96: 1027-1035.

Cordeiro MG, Taylor OG and Henry JR (2000) Characterisation of microsatellite markers from sugarcane (*Saccharum* sp.), a highly polyploid species. *Plant Science* 155:161–168.

Cox M, Hogarth M and Smith G (2000) Cane breeding and improvement. In Hogarth M and Allsopp P (eds) *Manual of cane growing*. Bureau of Sugar Experimental Stations, Indooroopilly, Australia, pp 91-108.

Creste S, Tulmann A and Figueira A (2000) Detection of Single Sequence Repeat Polymorphisms in Denaturing Polyacrylamide Sequencing Gels by Silver Staining. *Plant Mol Bio Reporter* 19:299–306.

D'Hont A, Grivet L, Feldmann P, Rao S, Berding N and Glaszmann JC (1996) Characterization of the double genome structure of modern sugarcane cultivars (*Saccharum* spp.) by molecular cytogenetics. *Mol Gen Genet* 250:405-413.

D'Hont A, Ison D, Alix K, Roux C, Glaszmann JC (1998) Determination of basic chromosome numbers in the genus *Saccharum* by phisycal mapping of ribosomal RNA genes. *Genome* 41: 221-225.

D'Hont A, Hourou JY, Butterfield M, Roques D, Telismart H, Lecunff L, Oliveira KM and Raboin LM (2006) Genetic mapping in sugarcane, a high polyploidy, using bi-parental progeny: identification of a gene controlling stalk colour and a new rust resistance gene. *Theor Appl Genetic* 112:1382–1391.

Daniels J and Roach BT (1987) Taxonomy and evolution. In Heiz DJ (ed) *Sugarcane improvement through breeding* Elsevier, Amsterdam, Netherlands 11:7-84.

De Medeiros SR and Machado PF (1993) Effect of the replacement of steam treated sugarcane bagasse by milo upon performance of finishing cattle. *Liv Res Rural Develop* 5: <http://www.cipav.org.co/lrrd/lrrd5-2/brazil2.htm>.

Demeke T, Sasikumar B, Hucl P and Chibbar RN (1997) Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) in cereal improvement. *Maydica* 42:133-142.

Doerge RW and Craig BA (2000) Model selection for quantitative trait locus analysis in polyploids. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:7951–7956.

Dos Santos JB, Nienhuis J, Skroch P, Tivang J and Slocum MK (1994) Comparison of RFLP genetic markers in determining genetic similarity among *Brassica oleracea* L. genotypes. *Theor Appl Genet* 87:909-915.

Dudley JW, Saghai Maroof MA and Rufener GK (1991) Molecular markers and grouping of parents in a maize breeding program. *Crop Sci* 31:718-723.

Enriquez-Obregon GA, Vazquez PRI, Prieto SDL, Riva-Gustavo ADL and Selman HG (1998) Herbicide resistant sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) plants by Agrobacterium-mediated transformation. *Planta* 206:20–27.

Falconer DS and Mackay TFC (1996) *Introduction to Quantitative Genetics*. 4 ed Oxford; Longman, 464 pp.

Ferreira EM and Grattapaglia D (1998) *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*. 3° ed. Brasília: EMBRAPA- CERNAGEN 220 pp.

Franks T, Botta R and Thomas MR (2002) Chimerism in grapevines: implications for cultivar identity, ancestry and genetic improvement. *Theor Appl Genet* 104:192-199.

Gallo-Meagher M and Irvine JE (1996) Herbicide resistant transgenic sugarcane plants containing the bar gene. *Crop Sci* 36:1367–1374.

Garcia AAF, Benchimol LL, Barbosa AMM, Geraldi IO, Souza CL and Souza AP (2004) Comparison of RAPD, RFLP, AFLP and SSR markers for diversity studies in tropical maize inbred lines. *Genet Mol Biol* 27:579-588

Garcia AAF, Kido EA, Meza AN, Souza HMB, Pinto LR, Pastina MM, Leite CS, da Silva JAG, Ulian EC, Figueira A and Souza AP (2006) Development of an integrated map of a sugarcane (*Saccharum spp.*) commercial cross, based on a maximum-likelihood approach for estimation of linkage and linkage phases. *Theor Appl Genet* 112:298–314.

Gerber S, Mariette S, Streiff R, Bodénès C and Kremer A (2000) Comparison of microsatellites and amplified fragment length polymorphism markers for parentage analysis. *Mol Ecol* 9:1037-1048.

Grivet L and Arruda P (2001) Sugarcane genomics: depicting the complex genome of an important tropical crop. *Curr Opin Plant Biol* 5:122-127.

Guimarães CT (1999) Mapeamento comparativo e detecção de QTLs em cana-de-açúcar utilizando marcadores moleculares. Viçosa. 70 p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Guimarães CT, Sills GR and Sobral B (1997) Comparative mapping of Andropogoneae: *Saccharum* L. (sugarcane) and its relation to sorghum and maize. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:14261–14266.

Gupta KP, Balyan SH, Rustgi S, Bandopadhyayi R and Roy KJ (2006) Association analysis of agronomically important traits using SSR, SAMPL and AFLP markers in bread wheat. *Curr Sci* 5:683-689.

Heinz DJ and Mee GW (1969) Plant differentiation from callus tissue of *Saccharum* species. *Crop Sci* 9:346–348.

Herring AJ, Inglis NF, Ojeh CK, Snodgrass DR and Menzies JD (1982) Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver-stained polyacrylamide gels. *J Clin Microbiology* 16:473-477.

Hoarau JY, Grivet L, Offmann B, Raboin LM, Diorflar JP, Payet J, Hellmann M, D'Hont and Glazsmann JC (2002) Genetic dissection of a modern cultivar (*Saccharum* spp.). II Detection of QTLs for yield components. *Theor Appl Genet* 105:1027–1037.

Hoarau JY, Offmann B, D'Hont A, Risterucci AM, Roques D, Glazsmann JC and Grivet L (2001) Genetic dissection of a modern sugar cane cultivar (*Saccharum* spp.) I. Genome mapping with AFLP markers. *Theor Appl Genet* 103:84–97.

Hoffman D and Dahleen L (2002) Markers polymorphic among malting barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivars of a narrow gene pool associated with key QTLs. *Theor Appl Genet* 105:784–800.

Joyce PA, McQualter RB, Bernad MJ and Smith GR (1998a) Engineering for resistance to SCMV in sugarcane. *Acta Hort* 461:385–391.

Joyce PA, McQualter RB, Handley JA, Dale JL, Harding RM and Smith GR (1998b) Transgenic sugarcane resistant to sugarcane mosaic virus. In: Hogarth D and (ed) *Proc Aust Soc Sugarcane Technol* 20:204–210.

Katengam S, Crane JM and Knapp SJ (2002) The development of a genetic map for meadowfoam comprised of amplified fragment length polymorphisms. *Theor Appl Genet* 104:92–96.

Kido EA (2003) Mapeamento de marcadores moleculares AFLP em população derivada de clones elite de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) e suas associações com caracteres agrônômicos. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo.

Lakshmanan P, Geijskes RJ, Aitken KS, Grof CPL, Bonnett GD and Smith GR (2005) Sugarcane biotechnology: the challenges and opportunities. *Cel Develop Biol Plant* 41:345-363

Lander ES and Botstein D (1989) Mapping Mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics* 121:185-199.

Leibbrandt NB and Snyman SJ (2003) Stability of gene expression and agronomic performance of a transgenic herbicide-resistant sugarcane line in South Africa. *Crop Sci* 43:671–678.

Lima MLA, Garcia AAF, Oliveira KM, Matsuoka S, Arizono H, Souza Jr CL and Souza AP (2002) Analysis of genetic similarity detected by AFLP and coefficient of parentage among genotypes of sugar cane (*Saccharum* spp.). *Theor Appl Genet* 104:30-38.

Litt M and Luty JA (1989) A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am J Hum Genet* 44:397-401.

Ma H, Albert HH, Paull R and Moore PH (2000) Metabolic engineering of invertase activities in different subcellular compartments affects sucrose accumulation in sugarcane cells. *Aust J Plant Physiol* 27:1021–1030.

Machado EC (1987) Fisiologia da produção de cana-de-açúcar. In: PARANHOS, S B (Coord.) *Cana-de-açúcar: cultivo e utilização*. Campinas: Fundação Cargill. 1:57-87.

Mackintosh D (2000) Sugar Milling Manual of cane growing In Hogarth M, Allsopp P (eds) *Bureau of Sugar Experiment Stations, Indooroopilly, Australiz* pp 369-377.

Mamet LD and Domaigne R (1999) Shortening the selection progress for sugarcane. *Experim Agric* 35:391-405.

Manickavasagam M, Ganapathi A, Anbazhagan VR, Sudhakar B, Selvaraj N, Vasudevan A and Kasthuriangan S (2004) Agrobacterium mediated genetic transformation and development of herbicideresistant sugarcane (*Saccharum* species hybrids) using axillary buds. *Plant Cell Rep* 23:134–143.

Menz AM, Klein RR, Muller EJ, Obert AJ, Unruh CN and Klein EP (2002) A high-density genetic map of *Sorghum bicolor* (L.) Moench based on 2926 AFLP, RFLP and SSR markers. *Plant Mol Biol* 48:483–499.

Merril CR, Goldman D, Sedman SA and Ebert MH (1981) Ultrasensitive stain for proteins in polyacrylamide gels shows regional variation in cerebrospinal fluid proteins. *Science* 211:1437-1438.

Ming R, Liu SC, Lin YR., Da Silva J, Wilson W, Braga D, van Deynze A, Wenslaff T F, Wu KK, Moore PH, Burnquist W, Sorrells ME, Irvine JE and Paterson AH (1998) Detailed alignment of *Saccharum* and *Sorghum* chromosomes: comparative organization of closely related diploid and polyploid genomes. *Genetics* 150:1663–1682.

Ming R, Liu SC, Moore PH, Irvine JE and Paterson AH (2001) QTL analysis in a complex autopolyploid: genetic control of sugar content in sugarcane. *Genome Research* 11:2075-2084.

Ming R, Wang WY, Draye X, Moore PH, Irvine JE and Paterson AH (2002) Molecular dissection of complex traits in autopolyploids: mapping QTLs affecting sugar yields and related traits in sugarcane. *Theor Appl Genet* 105:332–345.

Neale DB and Harry DE (1994) Genetic mapping in forest trees: RFLPs, RAPDs and beyond. *Ag Biotech News* 6:107-114.

Nickell LG (1964) Tissue and cell cultures of sugarcane: another research tool. *Hawaii Plant Rec* 57:223–229.

Nurmi DA , Terefework Z , Kaijalainen S , Lindstro K and Hatak A (2000) Silver stained polyacrylamide gels and fluorescence-based automated capillary electrophoresis for detection of amplified fragment length polymorphism patterns obtained from white-rot fungi in the genus *Trametes*. *J Micro Met* 41:161–172.

Oliveira PRD, Scotton CD, Nishimura ND and Figueira A (2005) Análise da diversidade genética por AFLP e identificação de marcadores associados à resistência a doenças em videira. Jaboticabal – SP. *Rev Bras Frutic* 3:454-457

Oliveira, MAS (2003) A relação capital-trabalho na agroindústria sucroalcooleira paulista e a intensificação do corte mecanizado: gestão do trabalho e certificação ambiental. 226 f. Dissertação (Mestrado em Geografia) - Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista, Presidente Prudente.

Playne MJ (1984) Increased digestibility of bagasses by pretreatment with alkalis and steam explosion. *Biotechnology and Bioengineering* 26:426-433.

Popescu CF, Falk A and Glimelius K (2002) Application of AFLPs to characterize somaclonal variation in anther-derived grapevines. *Vitis Sieboldingen* 4:177-182.

Powell W, Morgante M, Andre C, Hanafey M, Vogel J, Tingey S and Rafalski A (1996) The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for gemplasm analysis. *Molecular Breeding* 2:225-238.

Pursglove JW (1972) Tropical crops: Monocotyledons. Longman Scientific and Technical, New York, 607pp.

Rathus C and Birch RG (1992) Stable transformation of callus from electroporated sugarcane protoplasts. *Plant Sci* 82:81–89.

Resende AS (2003) Efeito da queima e das aplicações de nitrogênio e vinhaça após 16 anos de cultivo de cana-de-açúcar. UFRRJ. 118p. (Tese, Doutorado em Agronomia, Ciência do Solo).

Ribaut JM and Hoisington D (1998) Marker-assisted selection: New tools and strategies. *Trends Plant Sci* 3:236-238.

Rodrigues JD (2005) Fisiologia da Cana-de-Açúcar. Tese de Doutorado – Botucatu.

Rongwen J, Cregan PB, Akkaya MS, Bhagwat AA and Lavi U (1995) The use of simple sequence repeat DNA markers for soybean genotype identification. *Theor Appl Genet* 90:43-48.

Rostoks N, Mudie S, Cardle L, Russell J, Ramsay L, Booth A, Svensson JT, Wanamaker SI, Walia H, Rodriguez EM, Hedley PE, Liu H, Morris J, Close TJ, Marshall DF and Waugh R (2005) Genome-wide SNP discovery and linkage analysis in barley based on genes responsive to abiotic stress. *Mol Genet Genomics* 274(5):515-527.

Rumin GCR (2005) Análise da interação genótipo x ambiente assistida por marcadores moleculares em milho (*Zea mays* L.). Tese (Doutorado)- Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz.

Russell RJ, Fuller JD, Macaulay M, Hats BG, Jahoor A, Powell W and Waugh R (1997) Direct comparison of levels of genetic variation among barley accessions detected by RFLPs, AFLPs, SSRs and RAPDs. *Theor Appl Genet* 95:714-722.

Salland C, Lorieux M, Roumen E, Tharreau D, Berruyer R, Svestasrani P, Grasmieur O, Ghesquire A and Notteghem JL (2003) Identification of five new blast resistance genes in the highly blast resistant variety IR 64 using a QTL mapping strategy. *Theor Appl Genet*. 106:794–803.

Sanguinetti CJ, Dias Neto E, and Simpson AJG (1994) Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques* 17: 915-919.

Sansoucy R, Aarts G and Leng RA (1988) Molasses-urea blocks as a multinutrient supplement for ruminants. Available from: <http://www.fao.org/docrep/003/s8850e/S8850E24.htm>

Santos CAF and Simon PW (2002) Some AFLP amplicons are highly conserved DNA sequences mapping to the same linkage groups in two F₂ populations of carrot. *Genet Mol Biol* 25:195-201.

Santos FR, Pena SDJ and Epplen JT (1993) Genetic and population study of a Y-linked tetranucleotide repeat DNA polymorphism with a simple non-isotopic technique. *Human Genet* 90:655-656.

Scott KD, Ablett EM, Lee LS and Henry RJ (2000) AFLP markers distinguishing an early mutant of Flame Seedless grape. *Euphytica* 113(3):245-249.

SEBRAE (2005) O Novo Ciclo da Cana: Estudo sobre a Competitividade do Sistema Agroindustrial da Cana-de-açúcar e Prospecção de Novos Empreendimentos. Brasília: IEL/NC; 337 pp.

Senior ML and Heun M (1993) Mapping maize microsatellites and polymerase-chain-reaction confirmation of the targeted repeats using a ct iniciador. *Genome* 36:884-889.

Setamou M, Bernal JS, Legaspi JC, Mirkov TE and Legaspi BC (2002) Evaluation of lectin-expressing transgenic sugarcane against stalkborers (Lepidoptera: Pyralidae): effects on life history parameters. *J Econ Entomol* 95:469-477.

Sills GR, Bridges W, Al-Janabi S and Sobral BWS (1995) Genetic analysis of agronomic traits in a cross between sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) and its presumed progenitor (*S. robustum* Brandes & Jesw.Ex Grassl). *Molecular Breeding* 1:355-363.

Silva JA and Bressiani JA (2005) Sucrose synthase molecular marker associated with sugar content in elite sugarcane progeny. *Genet Mol Biol* 28(2):294-298.

Smith GR, Joyce PA, Handley JA, Sithisarn P, Maugeri MM, Bernad MJ, Berding N, Dale JL and Harding RM (1996) Genetically engineering resistance to sugarcane mosaic and Fiji disease viruses in sugarcane. In Wilson JR., Hogarth DM, Campbell JA and Garside AL (eds) *Sugarcane: research towards efficient and sustainable production*. Brisbane: CSIRO Division of Tropical Crops and Pastures pp 138-140.

Smith OS, Smith JSC, Bowen SL, Tenborg RA and Wall SJ (1990) Similarities among a group of elite maize inbreds as measured by pedigree, F1 heterosis, and RFLPs. *Theor Applied Genet* 80:833-840.

Sommerville LL and Wang K (1981) The ultrasensitive silver protein stain also detects nanograms of nucleic acids. *Biochem Biophys Res Commun* 102: 530-548.

Souza HMB (2003) Mapeamento genético de híbridos comerciais de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) utilizando marcadores moleculares do tipo microssatélite Tese (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura 'Luiz de Queiroz', Universidade de São Paulo. Piracicaba 98p.

Sreenivasan TV, Ahloowalia BS and Heinz D J (1987) Cytogenetics. In Heinz DJ (ed) Sugarcane improvement through breeding Elsevier, Amsterdam, pp 211-253.

Steele KA, Edwards G, Zhu J and Witcombe JR (2004) Marker-evaluated selection in rice: shifts in allele frequency among bulks selected in contrasting agricultural environments identify genomic regions of importance to rice adaptation and breeding. *Theor Appl Genet* 109(6):1247-1260.

Strommer J, Peters J, Zethof J, Kenkeleire P and de Gerats T (2002) AFLP maps of *Petunia hybrida*: building maps when markers cluster. *Theor Appl Genet* 105: 1000–1009.

Stuber CW, Mull RH, Goodman MM, Shaffer HE and Weir BS (1980) Allozyme frequency changes associated with selection for increased grain yield in maize (*Zea mays* L.). *Genetics* 95:225-236.

Taramino G and Tingey S (1996) Simple sequence repeats for germplasm analysis and mapping in maize. *Genome* 39:277-287.

Tautz D (1989) Hypervariability of simple sequences as a general source of polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Res* 17:6463-6471.

Thormann CE, Ferreira ME, Camargo LEA, Tivang JG and Osborn TC (1994) Comparison of RFLP and RAPD markers to estimating genetic relationships within and among cruciferous species. *Theor Appl Genet* 88:973-980.

UM Industrial Development Organisation (2002) Hydrolysed bagasse to make animal feed. Available from http://unido.org/file-storage/download/file_id_8396

Veldboon LL and Lee M (1996) Genetic mapping of quantitative trait loci in maize in stress and nonstress environments. *Crop Science* 36:1320-1327.

Vickers JE, Grof CPL, Bonnett GD, Jackson PA, Knight DP, Roberts SE and Robinson SP (2005a) Overexpression of polyphenol oxidase in transgenic sugarcane results in darker juice and raw sugar. *Crop Sci* 45:354–362.

Vickers JE, Grof CPL, Bonnett GD, Jackson PA and Morga E (2005b) Effects of tissue culture, biolistic transformation, and introduction of PPO and SPS gene constructs a performance of sugarcane clones in the field. *Aust J Agri. Res* 56:57–68.

Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M and Zabeau M (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucl Acids Res* 23: 4407–4414.

Williams JKF, Kubelik AR, Livak KG, Rafalki JA and Tingey SV (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary iniciadores are useful as genetic markers. *Nucl Acids Res* 18:6531-6535.

Wu J, Jenkins NJ, McCarty CJ, Zhong M and Swindle M (2007) AFLP marker associations with agronomic and fiber traits in cotton. *Euphytica* 153:153-163.

Wu KK, Burnquist W, Sorrells ME, Tew TL, Moore PH and Tanksley SD (1992) The detection and estimation of linkage in polyploids using single-dose restriction fragments. *Theo Appl Genet* 83:294-300.

Yin X, Stam P, Kropff MJ and Schapendonk HCM (2003) Crop modeling, QTL Mapping, and their complementary role. *Plant Breed Agro J* 95:90-98.

Yu KS, Park A and Poysa V (2000) Marker-assisted selection of common beans for resistance to common bacterial blight: Efficacy and economics. *Plant Breed* 119: 411–415.

Zabeau M and Vos P (1993) Selective restriction fragment amplification: A general method for DNA fingerprinting. European Patent Application number 92402629.7. Publication number 0534858A1.

Zhang L, Xu J and Birch RG (1999) Engineered detoxification confers resistance against a pathogenic bacterium. *Nature Biotechnol.* 17:1021–1024.

Zhang T, Yuan Y, Yu J, Guo W and Kohel JR (2003) Molecular tagging of a major QTL for fiber strength in Upland cotton and its marker-assisted selection. *Theor Appl Genet* 106:262–268.

Zhao XP and Rochert G (1993) Phylogenetic distributions and genetic mapping of a (GGC) (n) microsatellite from rice (*Oryza sativa* L.) *Plant Mol Biol* 21:607-614.

Zimnoch-Guzowska E, Marczewski W, Lebecka R, Flis B, Schäfer-Pregl R, Salamini F and Gebhardt C (2000) QTL analysis of new sources of resistance to *Erwinia carotovora* ssp *atroseptica* in potato done by AFLP, RFLP, and resistance-gene-like markers. *Crop Sci* 40:1156-1167.

5. Artigo Científico

Associação de marcadores (AFLP) com caracteres de interesse agrônômico em clones elite de cana-de-açúcar (*Saccharum spp*)

¹Diniz MC*, ²Bressiani JA, ²Da Silva JA, ²Ulian EC, ²Burqüist WL, ³Figueira AVO, ¹Kido EA*

¹Laboratório de Genética Molecular, Departamento de Genética, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Moraes Rego S/N, Cidade Universitária, 50670-901, Recife, PE. *autores para correspondência. E-mail: ederson.kido@gmail.com; michely.diniz@gmail.com

²Centro de Tecnologia Canaveira- CTC-Piracicaba-SP

³Centro de Energia Nuclear na Agricultura-CENA- Piracicaba-SP

Abstract

Brazil is the biggest producer of sugarcane, one of the main biomass sources. Ethanol obtained from sugarcane is a potentially global fuel, because it's capable of minimizing two worldwide problems: the scarcity of oil and the greenhouse effect. The sugarcane breeding requires evaluations in many assays (different years and locals). Molecular markers can help genetic programs like these. AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphisms) is a multiplex technique, useful for generation of a great number of markers from few primers combinations. This work had as objective to detect phenotype-marker associations in elite clones (progeny 234/96) from Brazilian sugarcane improvement program. AFLP markers and three characters data [Fiber%Cane, PCC (POL%Cane) and TCH (tons of sugarcane per hectare)] from eight assays, comprising two cycles of the culture (plant cane and first ratoon cycle) in two localities (Piracicaba / SP and Jaú / SP) were analyzed. Significant phenotype-marker associations ($p < 0.05$) have been observed and possible QTLs (quantitative trait loci) of positive or negative effect were detected for each character individually. Some markers showed significant phenotype-marker associations with more than one character. The DNA sequence from one AFLP fragment was used for primer design. These primers amplified by PCR with DNAs from 234/96 progeny three markers of negative effect when associated with Fiber%Cane, one of them also associated with TCH (positive effect). These markers are promising candidates for use in Marker Assisted Selection, helping sugarcane breeding programs.

Keyword: sugarcane, Marker Assisted Selection, AFLP, QTL, Improvement program.

Introdução

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp) é responsável por cerca de 70% da produção mundial de açúcar. Embora seja cultivada em mais de 120 países somente com este propósito, no Brasil ela se destina também para a geração de etanol, combustível potencialmente global, que faz do país um dos principais a adotá-lo em larga escala, como alternativa a escassez de petróleo e redução do efeito estufa (Oliveira, 2003). O bom desempenho da cana, no cenário econômico e social brasileiro, se deve ao relativo sucesso dos programas de melhoramento. Contudo eles são parcialmente dificultado pelo fato da cana-de-açúcar moderna ter um dos genomas mais complexos, com altos níveis de poliploidia e aneuploidia, com cerca de 100-130 cromossomos (Grivet and Arruda, 2001).

No país, um número relativamente grande de genótipos oriundos dos programas de melhoramento locais ou de outras regiões é avaliado continuamente, visando verificar seu desempenho e viabilidade em plantios comerciais. Dessa maneira, a indicação daqueles genótipos mais adaptados a cada microrregião produtora tem possibilitado a utilização de materiais superiores em produtividade, sem desconsiderar outras importantes características agroindustriais (Melo *et al.*, 2006)

A análise molecular via marcadores constitui uma ferramenta potencial para uso em programas de melhoramento, a partir do desenvolvimento da chamada Seleção Assistida por Marcadores (MAS – Lande and Thompson, 1990). Identificar as associações de marcadores moleculares com características quantitativas é essencial para a seleção assistida por marcador em genética de plantas e em programas de melhoramento. Entretanto, a poliploidia ainda é um desafio para

marcadores em cana-de-açúcar, mais do que em outras culturas, requerendo métodos biométricos aperfeiçoados para se extrair informações mais completas dos estudos de loci de características quantitativas QTLs - *Quantitative Trait Loci* (Grivet and Arruda, 2001).

A detecção de QTLs em poliplóides é dificultada pela possibilidade da segregação de vários alelos em um locus, contudo um subconjunto de alelos polimórficos que mostram segregação em dose simples podem ser usados para identificar QTLs (Wu *et al.*, 1992). Eles têm sido utilizados na construção de mapas genéticos em populações de cana-de-açúcar (Al Janabi *et al.*, 1993; da Silva *et al.*, 1993; Mudge *et al.*, 1996; Ming *et al.*, 1998; Hoarau *et al.*, 2001; McIntyre *et al.*, 2005; Garcia *et al.*, 2006).

Os primeiros estudos sobre detecção de QTLs em cana-de-açúcar foram realizados por Sills *et al.* (1995) e Guimarães *et al.* (1997), a partir de pequenas populações de mapeamento (44 e 100 indivíduos, respectivamente). Especial contribuição foi dada por Ming *et al.* (2001), ao investigar a base genética relacionada ao conteúdo de açúcar, peso da planta e floração, em cruzamentos interespecíficos de *S. officinarum* e *S. spontaneum*. Os QTLs detectados em poucas regiões genômicas sugeriram poucos genes envolvidos no controle genético dessas características, necessitando de maiores estudos para comprovação. De modo análogo, um estudo dos componentes de produção (peso da planta, número e diâmetro do colmo, e Brix), na progênie de autofecundação do cultivar R570, revelou numerosos QTLs com pequenos efeitos individuais (Hoarau *et al.*, 2002), conforme esperado para caracteres de natureza quantitativa.

No presente estudo, marcadores moleculares do tipo AFLP (polimorfismo de comprimento de fragmento amplificado) foram submetidos a análises de marcas simples visando a detecção de associação com os caracteres teor de fibra (Fibra%Cana), PCC (POL%Cana) e TCH (tonelagem de cana por hectare), oriundos de oito diferentes ensaios, abordando os estádios de cana-planta e cana-soca avaliados principalmente em Piracicaba, SP, mas também em Jaú, SP. Marcadores promissores foram identificados, além da proposição de um par de iniciadores, obtido a partir de marcadores AFLPs, para amplificação via PCR de fragmentos específicos, visando uso futuro em seleção assistida.

Material e Métodos

Progênie em estudo e Ensaios de Produção

A progênie 234/96, formada por clones elite do Programa de Melhoramento Genético do Centro de Tecnologia Canavieira (Piracicaba, SP), oriunda dos genitores 'SP80-180 e SP80-4966', foi objeto de estudo deste trabalho. Cerca de 100 indivíduos haviam sido previamente genotipados com marcadores RFLP (Meza, 2002), AFLP (Kido, 2003) e SSR (Souza, 2003). Essa progênie e respectivos genitores dispunham de dados relativos aos caracteres PCC (POL%Cana), fibra (Fibra%Cana) e TCH (tonelagem de cana por hectare) obtidos de oito ensaios de produção (envolvendo os ciclos de cana-planta e cana-soca), realizados durante os anos de 2000 – 2005, seis dos quais conduzidos em Piracicaba (SP) e dois em Jaú (SP). Estudo preliminar foi realizado com a progênie 187/97, oriunda dos genitores 'SP85-7215 e SP80-144', que dispunha de dois ensaios (cana-planta e cana-soca) referentes ao plantio de 2002, em Piracicaba / SP. Os ensaios de campo foram conduzidos em blocos ao acaso

com presença de tratamentos comuns e analisados conjuntamente, conforme procedimentos empregados pelo corpo técnico do CTC.

Extração de DNA

DNA da progênie 234/96 usada por Kido (2003) estava disponível. A extração de DNA foi feita para 30 indivíduos da progênie 187/97, a partir do palmito de cana-de-açúcar, de acordo com Al Janabi (1999), sendo as amostras trituradas em nitrogênio líquido. A concentração de DNA foi estimada em fluorômetro DyNA Quant 2000 - Hoefer e padronizada em 25 ng. μL^{-1} .

Ensaio com AFLP

DNAs (em torno de 250 ng), de cerca de 35 indivíduos, da progênie 234/96 foram submetidos às preparações de AFLP, conforme manual do kit AFLP 'Analysis System I' (Invitrogen). Nas reações de PCR seletiva foram usados 11 pares de iniciadores *Eco/Mse*, conforme Kido (2003). A ciclagem realizada em termociclador Biometra[®], com 1 ciclo de 94°C por 1 min, 65°C por 1 min, 72°C por 1 min e 30 seg; 13 ciclos começando com temperatura de anelamento de 65°C, depois caindo 0,7°C em todo ciclo subsequente; por fim, 27 ciclos de 94°C por 1 min, 56°C por 1 min e 72°C a 1 min.

Eletroforese e Visualização dos Fragmentos

Os produtos de PCR foram desnaturados em tampão formamida e submetidos à eletroforese vertical em gel de poliacrilamida 7% (p/v), em condição desnaturante (uréia 7 M), em tampão 1X Tris-Borato-EDTA (TBE). Foi feita uma pré-corrída de 30 min a 50 W. Alíquota de 5 μL de produto de PCR foi carregada no gel, seguindo-se de corrida de 1h e 45 min a 55 W. Foi utilizado marcador de 50 pb (Invitrogen) durante as corridas. O gel foi corado de acordo com adaptações

de Beidler *et al.* (1982): o gel foi imerso na solução fixadora (10% etanol; 1% ácido acético glacial) com agitação por 10 min; pré-tratamento (1% ácido nítrico) por 5 min; impregnação (0,2% de AgNO₃) por 20 min; a revelação (3% de NaCO₃, com adição de 540 µL de formaldeído) deu-se até o aparecimento completo das bandas; bloqueio da reação (5% ácido acético glacial) por 10 min. Entre cada etapa, lavou-se o gel por 1 min com água destilada. A foto-documentação do gel foi feita após a secagem e digitalização da imagem.

Desenvolvimento de marcadores derivados de iniciadores específicos

Bandas promissoras foram retiradas do gel seco, com lâminas de bisturi, e eluídas *overnight* a 4°C em tampão TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 8). 5 µL do eluído foi re-amplificado com os iniciadores originais e os produtos de PCR foram submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida 16% (p/v). A banda alvo foi excisada do gel e colocada em tubo de 1,5 mL, com 125 µL de LoTE (3 mM Tris-HCl, 0,2 mM EDTA pH 7,5) e 25 µL de acetato de amônio 7,5 M, sendo incubada por 12 horas a 4°C e, depois por 65°C / 45 min. Após passagem pela coluna S.N.A.P[®] (Invitrogen), foram adicionados à solução 67 µL de acetato de amônio, 1,5 µL de glicogênio e 500 µL de etanol absoluto para precipitação do DNA, seguindo-se de incubação (1 hora a -80°C) e centrifugação. Os fragmentos precipitados foram lavados com etanol 70% e ressuspensos em 20 µL de TE. A concentração do produto de PCR para a reação de seqüenciamento foi baseada no tamanho do fragmento em pb, sendo que para um fragmento de 100 pb usou-se 1 ng.µL⁻¹. A reação foi composta de produto de PCR, 0,5 µL de iniciador Eco+3 da reação inicial, 1 µL de *Big Dye Terminator Cycle Sequencing*[®], 2 µL de Tampão 5X, em volume final de 10 µL. A ciclagem e a purificação da reação deu-se

conforme Figueiredo *et al.* (2003). As amostras foram submetidas ao seqüenciador automático modelo ABI 3100 da *Applied Biosystems*. Seqüências analisadas foram utilizadas para desenho de iniciadores com o programa *Primer 3* (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) e os iniciadores testados em reações de PCR com DNAs de 60 amostras da progênie 234/96 e de 30 da progênie 187/97. Foram utilizados 25 ng de DNA, 1,5 mM MgCl₂, 200 µM dNTPs, 2,5 µL de Buffer 10X, 0,3 µM de cada iniciador e 0,5 U Taq DNA Polimerase. A termociclagem utilizada foi 94 °C - 2min; seguido de 35 ciclos de 94 °C - 1min; 50 °C - 1min; 72 °C - 1min; e uma extensão final de 72 °C por 5 min.

Verificação do tipo de dose dos marcadores

Marcadores polimórficos entre os genitores foram classificados, de acordo com Kido (2003), em “a” [(quando presentes nos genitores ‘SP80-180’ (progênie 234/96) ou ‘SP80-144’ (progênie 187/97) e ausentes nos outros genitores)] ou “b” [(quando presentes nos genitores ‘SP80-4966’ (progênie 234/96) ou ‘SP85-7215’ (progênie 187/97) e ausente nos demais)]. Marcadores presentes em ambos genitores de cada progênie (‘SP80-180’ e ‘SP80-4966’; ‘SP80-144’ e ‘SP85-7215’) foram classificados em “c”. Marcadores em doses simples do tipo “a” e “b” devem segregar na progênie na razão 1:1 e aqueles do tipo “c”, na razão 3:1. Para marcadores em dose múltiplas não há segregação esperada. A distinção de marcadores em dose simples ou múltipla foi feita aplicando-se o teste χ^2 , $p < 0,05$; GL=1 (Kido, 2003; McIntyre *et al.*, 2005).

Deteção da associação fenótipo-marcador e classificação em QTL / QTLp

Dígitos binários foram atribuídos à presença (1) ou ausência (0) de bandas no gel para a realização das análises estatísticas (Ver anexos). Análises de marca

simples (ANAVA e análise de regressão linear) realizaram-se conforme Hoarau *et al.* (2001) e Kido (2003). Análises de variância permitiram testar os efeitos entre as médias das classes de portadores e não portadores de banda para um caráter, e as análises de regressão linear para estimar a contribuição do marcador na variância fenotípica total (R^2). As análises foram feitas com o auxílio do programa 'STATISTICA' (Statsoft, 1999). Diferenças significativas indicariam existência de ao menos um alelo (para presença de banda) em associação a um loco controlador de caráter quantitativo (QTL). Os níveis de significância seguiram àqueles adotados por Kido (2003): associação significativa a partir de $p < 0,05$, mas classificando como QTL a partir de $p < 0,005$ (Guimarães, 1999; Horau *et al.*, 2002) e QTLp (presumível) quando $p < 0,01$ (Ming *et al.*, 2001, 2002). A condição presumível aqui se refere à necessidade de confirmação em estudos adicionais.

Resultados

Marcadores AFLP gerados e associação fenótipo-marcador

660 marcadores foram obtidos com a amplificação pelos 11 pares de iniciadores AFLP nos indivíduos da progênie 234/96. Em média foram amplificados em torno de 60 fragmentos por par de iniciadores (**Figura 1**). Dos 660 marcadores, 91 (14%) segregaram nesta amostra da progênie, dos quais, 39 estiveram relacionados com as 123 associações detectáveis ($p < 0,05$) com no mínimo um caráter, mas somente 22 foram relacionados com as 41 associações consideradas QTL ou QTLp. Desses 22 marcadores, 13 (11 em dose simples e dois em dose múltipla) tiveram associações detectadas em um maior número de ensaios (**Tabela 1,2,3**).

Marcadores AFLP associados com Fibra

De acordo com a **Tabela 1**, o marcador simplex ACGCAA12c, de efeito negativo e presente nos genitores SP80-180 e SP80-4966, foi detectado em associação com Fibra%Cana em sete dos oito ensaios (87% de detecção), sendo declarado ao menos QTLp em 57% das situações detectadas (três QTLp e um QTL). Os marcadores simples AACCAT61c, de efeito negativo presente nos genitores acima, e AGGCAG25b, de efeito positivo (média de 0,9%) presente somente no genitor SP80-4966, foram detectados, separadamente, em seis dos oito ensaios (75%), sendo que das seis associações detectadas, três (50%) foram consideradas QTLp. O segundo marcador foi declarado ao menos QTLp somente em uma das seis detecções (17%). Já o marcador multiplex de efeito negativo ACTCAC25c foi detectado em cinco dos oito ensaios (62%), mas em nenhuma das ocasiões foi considerado QTL ou QTLp. O único marcador de efeito positivo para Fibra%Cana, com detecção freqüente (seis dos oito ensaios: 75%), simplex AGGCAG25b (presente no genitor SP80-4966), somente em uma das detecções foi considerado ao menos QTLp (17%). A contribuição individual desses marcadores na variância fenotípica total para o caráter foi de 8 a 21% (**Tabela1**).

Marcadores AFLP associados com PCC

O marcador simplex de efeito positivo AAGCTC10c (presente em ambos os genitores) foi detectado em todos os oito ensaios (100% de detecção; **Tabela 2**) e em 62% das associações detectadas, estas foram consideradas ao menos QTLp (quatro QTLs e um QTLp). Ainda de acordo com a **Tabela 2**, o marcador simplex de efeito negativo ACCCAG16b foi detectado em associação em cinco ensaios (62%), sendo QTL em quatro deles (80% das associações detectadas). A

contribuição individual desses marcadores na variância fenotípica total para o caráter foi de 13 a 46% (**Tabela 2**). Dois outros marcadores foram detectados em no máximo três ensaios, e cinco outros em somente um (dados não mostrados).

Marcadores AFLP associados com TCH

O marcador AGGCAG40b (**Tabela 3**) foi detectado em seis dos oito ensaios (75% de detecção nos ensaios), com efeito positivo em todos eles, sendo que em três ensaios ele foi classificado como QTL, e em dois como QTLp ($3+2 = 5$ de $6 = 83\%$). O marcador ACTCAC20c, por sua vez, foi associado a quatro ensaios (4 de $8 = 50\%$), sendo o ensaio de 2005 em Piracicaba, considerado QTL presumível (1 em $4 = 25\%$). Outros três marcadores (multiplex ACACAC59c, de efeito negativo; simplex ACTCAC18a, também de efeito negativo, e simplex AGCCAG23b, de efeito negativo) foram detectados em no máximo três dos oito ensaios (37%; dados não mostrados). A contribuição individual desses marcadores na variância fenotípica total para o caráter variou de 9 a 26% (**Tabela 3**).

Marcadores AFLP associados com mais de um caráter

13 marcadores tiveram 48 associações detectadas (dados não mostrados), apresentando associações fenótipo-marcador para mais de um caráter. Para três marcadores simples, 16 associações foram detectadas para os três caracteres. Os marcadores mais comumente detectados foram: ACTCAC20c - seis associações [duas para PCC (efeito positivo) e quatro para TCH (efeito negativo; um QTLp)]; ACGCAA48a – cinco associações [quatro para fibra (efeito negativo) e uma para TCH (efeito negativo)]; AACCAT41b – cinco associações [três para TCH (efeito negativo) e duas para fibra (efeito negativo)]; AGGCAG40b – oito associações [seis para TCH (efeito positivo) e duas para PCC (efeito negativo)].

Marcadores derivados de iniciador específico em associação

Marcadores moleculares (**Figura 2**) foram obtidos de iniciadores desenhados a partir do seqüenciamento da banda AFLP ACCGAG31 (500 pb) (dado não mostrado), associada previamente com Fibra%Cana por kido (2003). Os iniciadores desenhados (M31F: 5'CGGGCCGCGATAGTAATTC3' e M31R: 5'TCGGGTATTAGCCCTTTGTG3') amplificaram de 5 a 24 amplicons, dos quais quatro mostraram-se polimórficos em 60 indivíduos da progênie 234/96. Desses, três (M31.Cc, M31.Da e M31.Ec; **Tabela 4**) foram associados significativamente ($p < 0,05$) com ao menos um dos caracteres. O marcador M31.Cc, de efeito negativo para Fibra%Cana, foi detectado em cinco dos oito ensaios (62%), enquanto o marcador M31.Da, aparentemente ausente no genitor SP80-4966, também de efeito negativo para Fibra%Cana, foi detectado em seis ensaios (75%), mas considerado QTLp somente no ensaio de cana-planta em Jaú, 2004 (17% das associações detectadas). Este mesmo marcador apresentou associações detectáveis para TCH, também em seis ocasiões (75%), três das quais consideradas QTL, de efeito negativo (50% das associações detectadas). O outro marcador gerado com o mesmo par de iniciadores, M31.Ec foi detectado em seis ocasiões (75%) também para o caráter fibra, de efeito negativo, duas das quais consideradas ao menos QTLp (33% das associações detectadas). O mesmo marcador foi detectado em associação em duas outras ocasiões e com diferentes caracteres: PCC, efeito positivo (ensaio de 2004, cana-planta, em Jaú) e TCH, efeito negativo, (ensaio de 2005, cana-soca, em Jaú). A avaliação preliminar da progênie 187/97 mostrou que o par de iniciador M31, amplificou apenas um

marcador (M31.Eb) com uma associação detectada ($p < 0,05$) com Fibra%Cana (ensaio de 2003; dados não mostrados), também de efeito negativo.

Discussão

A genotipagem dos híbridos com onze combinações de iniciadores AFLP gerou em média 60 fragmentos por combinação, diferentemente dos 125 reportados por Hoarau *et al.* (2001); e dos 111 relatados por de Lima *et al.* (2002) e dos 109 amplificados por Kido (2003), tal fato deve-se provavelmente ao método empregado, já que esses autores utilizaram metodologia radioativa, mais sensível (Briard *et al.*, 2000) que a adotada neste trabalho.

Em contrapartida, a existência de bons dados oriundos da experimentação (oito ensaios de campo para uma mesma população) constitui ponto positivo, um grande salto foi dado em relação aos estudos de Kido (2003) que utilizou apenas dois ensaios (2000/2001), além disso trabalhos recentes para cana-de-açúcar utilizaram dois e três ensaios (McIntyre *et al.*, 2005; Aitken *et al.*, 2006). Os coeficientes de variação (CV), menores que 14% (Ver anexos), estimados em todos os ensaios utilizados nesse trabalho indicaram bom controle experimental, permitindo que as diferenças entre os híbridos fossem detectadas nos estádios de cana-planta e cana-soca. Além disso, as interações entre padrões e ensaios para os três caracteres não foram significativas ($p < 0,05$), possibilitando que as médias de híbridos dos diferentes experimentos fossem ajustadas e comparadas (dados não mostrados).

De acordo com Al Janabi *et al.* (2007), embora a detecção de QTLs em poliplóides seja complicada pela possibilidade da segregação de vários alelos em um locus, um subconjunto de alelos polimórficos que mostram segregação simplex

podem ser usados para identificar QTLs. Esses autores geraram 666 marcadores (500 AFLPs e 166 SSRs), sendo que marcadores simplex e multiplex foram usados para identificação de QTL relacionado à resistência à mancha amarela em cana-de-açúcar.

No presente estudo, para o caráter fibra, os marcadores simplexes mais promissores foram ACGCAA12c, AACCAT61c e ACTCAC25c, todos de efeito negativo, isto é, os portadores da banda diminuiriam, em média, o percentual de fibra quando comparados com os não portadores da banda. De acordo com Ming *et al.* (2002), o conteúdo de fibras afeta tanto a produção de açúcar quanto a eficiência de moagem, possuindo uma correlação negativa com o conteúdo de açúcar, o que tornaria esses marcadores de efeitos negativos mais favoráveis para o melhoramento, pois possibilitaria maior acúmulo de açúcares. O baixo conteúdo em fibras estaria também relacionado com a diminuição do bagaço gerado, todavia o alto conteúdo em fibras reduziria o suco extraído da cana. Dos três marcadores, dois deles presentes em ambos os genitores da progênie 234/96, ACGCAA12c e AACCAT61c, foram associados com Fibra%Cana em mais que 75% dos ensaios sendo quase 50% das vezes em que a associação foi detectada, elas puderam ser classificadas como ao menos QTLp. A contribuição média individual desses marcadores na variância fenotípica total estimada para o caráter ficou entre 15-16%. As contribuições individuais dos QTLs em associação com fibra, estudados por Ming *et al.* (2002), variaram de 6 a 13%; e de 4 a 14% no estudo de Kido (2003) com a progênie 234/96.

Uma diferença entre os marcadores ACGCAA12c e AACCAT61c parece ser o fato do provável QTL referente ao primeiro marcador ser detectado tanto em

cana-planta quanto em cana-soca, ao passo que o segundo marcador seria mais específico para cana-soca (**Tabela 1**). A instabilidade entre ciclos, também observada por Hoarau *et al.* (2002) pode ser resultado do poder estatístico do método de detecção empregado (Conner *et al.*, 1998) ou mesmo da interação QTL x ambiente em nível molecular (Garcia *et al.*, 2000), visto que interações genótipo e ambiente que são rotineiramente encontradas em experimentos de melhoramento não foram observadas aqui, com as diferentes características. Interações desse tipo não devem ser consideradas problemas exclusivos da seleção auxiliada por marcadores, mas devem ser vistas sob qualquer forma de seleção artificial.

Por sua vez, QTLs de efeitos positivos para teor de fibra, como aquele associado ao marcador multiplex AGGCAG25b (**Tabela 1**), de média ao redor de 1%, poderiam ser interessantes para evitar rachaduras no colmo e na geração de bagaço, subproduto importante para a geração de energia.

Espera-se que efeitos de genes controladores de processos fisiológicos, tais como acúmulo de sacarose (POL%Cana - PCC), sejam altamente dependentes do contexto interativo de mecanismos genótipicos e fisiológicos (Peccoud *et al.*, 2004). Para o caráter PCC, o marcador mais promissor foi AAGCTC10c, detectado nos dois estádios e em ambos os genitores, tendo apresentado efeito positivo médio de 1,3%. Esse marcador teve 100% de associação detectada ($p < 0.05$) e em 53% das vezes foi considerado ao menos QTLp ($p < 0,01$). Outro marcador (ACCCAG16b) também detectado nos dois estádios, mas que deveria ser excluído dos genomas pelo seu efeito negativo médio de 1,3%, foi observado somente no genitor SP80-4966. Os dois

marcadores foram responsáveis, individualmente, por cerca de 30% da variância fenotípica observada para o caráter (**Tabela 2**). As contribuições individuais dos QTLs em associação com PCC, estudados por Ming *et al.* (2002), variaram de 4,1 a 15,4%; e de 4 a 22% nos estudos de Kido (2003), enquanto que nesse estudo a variação ocorreu de 13 a 46%, essa diferença deve-se provavelmente ao tamanho da amostra analisada.

A ausência de segregação de QTLs com grandes efeitos para PCC em parentais elite não é uma surpresa, uma vez que alelos com grandes efeitos aditivos positivos ou negativos, se presentes em todos os clones ancestrais, devem ser logo acumulados em altas doses (efeito positivo), ou eliminados do cruzamento (efeito negativo) (Aitken *et al.*, 2006). Contudo, se o número de QTLs segregantes com pequenos ou moderados efeitos aditivos ainda continuar nos parentais elite, conforme sugestão do estudo de Aitken *et al.* (2006), então a produção e seleção deve resultar em incrementos no ganho genético até que os alelos mais favoráveis de cada locus sejam fixados. Nos estudos realizados por Ming *et al.* (2001, 2002), conteúdo em açúcar foi correlacionado positivamente com POL. A descoberta de QTLs nas mesmas regiões genômicas de *S. officinarum* ('Green German' ou 'Muntok Java') que aumenta o conteúdo em açúcar, e de *S. spontaneum* ('IND 81-146' ou 'PIN 84-1') que diminui, demonstra a importância dessas regiões no controle da característica. Hoarau *et al.* (2002), em uma progênie de autofecundação do cultivar R570, a partir de marcadores AFLPs, estudaram o caráter Brix, em dois ciclos da cana-de-açúcar. Para Brix (característica relacionada com conteúdo de açúcar), eles detectaram três QTLs ($p < 0,005$) em dose simples e um em dose múltipla, que explicaram 9% da variância

observada para o caráter, no primeiro ciclo (cana-planta). Para cana-soca, eles reportaram oito QTLs em dose simples e um em dose múltipla, que responderam por 26% da variância, enquanto que as variações individuais foram de 3 a 5%.

Em relação ao caráter TCH, aqueles mais consistentes, de efeito negativo (dois simplexes e um multiplex), somente foram detectados em 38% dos ensaios, e na maioria das vezes não foram declarados nem ao menos QTLp (**Tabela 3**) Exceção foi verificada para os marcadores AGGCAG40b e M31. Da (**Tabela 3 e 4**) que foram associados com um maior número de ensaios para TCH, contudo também foram associados com outros caracteres. A contribuição fenotípica individual dos marcadores associados a TCH foi maior do que a observada por Kido (2003) para o mesmo caráter.

Um estudo realizado por McIntyre *et al.* (2005) para investigar regiões genômicas incorporadas em cultivares australianos a partir de parentais selvagens da cana australiana, utilizou marcadores AFLPs e SSRs, detectando apenas um marcador de efeito negativo, pertencente a um grupo de ligação, associado a TCH.

A análise conjunta dos dados referentes aos três caracteres avaliados mostrou que alguns marcadores apresentaram associações significativas com mais de um caráter. Ao total, 13 marcadores estiveram em associação 48 vezes (dados não mostrados). Comumente são identificados QTLs que afetam simultaneamente a expressão de diferentes características. Provavelmente porque às variáveis medidas são, na verdade, expressões diferenciais da mesma característica; ou devido a efeitos pleiotrópicos reais; ou mesmo porque há

presença de QTLs independentes em ação, porém adjacentes de forma que a resolução individual seja impossível (Ferreira and Grattapaglia, 1998).

Variações das características quantitativas são afetadas por muitos *loci*, e cada gene substituto pode ter efeitos em muitas características. Uma vez que a produção de açúcar e seus caracteres relacionados (POL, conteúdo em açúcar, número e peso do colmo), são estreitamente vinculados, tanto positivamente quanto negativamente, os efeitos pleiotrópicos de um QTL sobre as características relacionadas são freqüentemente observados. Caso os efeitos não sejam suficientemente grandes para alcançar significância, as influências desses QTLs nos variados caracteres podem ser refletidas pelo conjunto dos QTLs atuando na mesma região genômica (Ming *et al.*, 2002).

Outro marcador, M31.Da, teve associação fenótipo-marcador detectada em 75% dos ensaios tanto para Fibra%Cana quanto para TCH, sendo que em 50% das detecções para TCH essa foi classificada como QTL ($p < 0,005$). De maneira análoga, o melhoramento de múltiplas características simultaneamente implica problemas que freqüentemente levam ao sacrifício do ganho genético esperado em uma característica em favor de outra (Ferreira and Grattapaglia, 1998).

O par de iniciadores desenhado a partir de uma banda de mesma mobilidade eletroforética da banda ACCCAG31, previamente associada com o caráter Fibra%Cana (Kido, 2003) reduziu significativamente o número de amplicons gerados. Três marcadores amplificados (M31.Cc, M31.Da e M31.Ec) mostraram possuir associações fenótipo-marcador significativas ($p < 0,05$). Esses marcadores poderiam ser utilizados em conjunto de modo mais eficiente do que separadamente, visando auxiliar o melhoramento genético da cana-de-açúcar.

Confirmações a partir de diferentes variedades aumentariam a confiabilidade da existência do QTL, sugerindo que os marcadores de DNA ligados ao QTL pudessem ser usados com outros germoplasmas (Ming *et al.*, 2001). A avaliação preliminar do comportamento desses marcadores, derivados dos iniciadores específicos M31, numa segunda população (187/97), com dois ensaios de campo disponíveis, mostrou que apenas o marcador M31.Ec continuou a demonstrar associação, de efeito negativo, com o caráter fibra em um dos ensaios (dados não mostrados), necessitando de maiores estudos.

A seleção assistida quando comparada com a seleção puramente fenotípica mostra que o custo e a duração de um ciclo de seleção utilizando as associações fenótipo-marcador são muito reduzidos (Hospital *et al.*, 1997). Os dados advindos deste trabalho indicaram marcadores AFLP promissores associados com caracteres de interesse agronômico em cana-de-açúcar. Somando-se a isso, o uso da combinação de iniciador proposta, que também revelou marcadores interessantes em associação, apresentando a vantagem de ser mais simples e mais barato, pode tornar-se viável para aplicação futura em seleção assistida.

Agradecimentos: Aos órgãos financiadores deste trabalho CNPq, FACEPE; e aos parceiros: CENA – Centro de Energia Nuclear na Agricultura (Piracicaba-SP) e ao Programa de Melhoramento Genético do Centro de Tecnologia Canavieira (ex-COPERSUCAR (Piracicaba-SP).

Referências Bibliográficas

Aitken KS, Jackson AP and McIntyre CL (2006) Quantitative trait loci identified for sugar related traits in a sugarcane (*Saccharum* spp.) cultivar × *Saccharum officinarum* population. *Theor Appl Genet* 20:100-112.

Al Janabi SM, Honeycutt RJ, McCleand M and Sobral BWS (1993) A genetic linkage map of *Saccharum spontaneum* L. 'SES 208'. *Genetics* 134:1249-1260.

Al Janabi SM, Parmessur EY, Kross EH, Dhayan ES, Saumtally ES, Ramdoyal EK, Autrey LJC and Dookun-Saumtally EA (2007) Identification of a major quantitative trait locus (QTL) for yellow spot (*Mycovellosiella koepkei*) disease resistance in sugarcane. *Mol Breeding* 19:1–14.

AlJanabi SM, Forget L and Dookun A (1999) An Improved and Rapid Protocol for Isolation of Polysaccharide- and Polyphenol-Free Sugarcane DNA. *Plant Mol Biol Reporter* 17:1–8.

Beidler JL, Hilliard PR and Rill RL (1982) Ultrasensitive staining of nucleic acids with silver. *Anal Biochem* 126:374-380.

Briard M, Le Clerc V, Grzebelus D, Senalik D and Simon WP (2000) Modified Protocols for Rapid Carrot Genomic DNA Extraction and AFLP™ Analysis using Silver Stain or Radioisotopes. *Plant Mol Biol Reporter* 18:235–241.

Conner PJ, Brown SK and Weeden NF (1998) Molecular Analysis of Quantitative traits for growth and development in juvenile apple trees. *Theor Appl Genet* 96: 1027-1035.

Da Silva JAG, Sorrells ME, Burnquist WL and Tanksley SD (1993) RFLP linkage map and genome analysis of *Saccharum spontaneum*. *Genome* 36:782-791.

Ferreira EM and Grattapaglia D (1998) Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3º ed. Brasília: Embrapa-Cenargen 220pp

Figueiredo GS, Reis ACM, Castro AS, Bisol TB and Neto CRB (2003) Reação de Seqüenciamento de DNA e purificação. *Protocolos Otimizados Embrapa*. Brasília-DF.

Garcia AAF, Kido EA, Meza AN, Souza HMB, Pinto LR, Pastina MM, Leite CS, da Silva JAG, Ulian EC, Figueira A and Souza AP (2006) Development of an integrated map of a sugarcane (*Saccharum spp.*) commercial cross, based on a maximum-likelihood approach for estimation of linkage and linkage phases. *Theor Appl Genet* 112:298-314.

Garcia MR, Asinis MJ and Carbonell EA (2000) QTL analysis of yield and seed number in *Citrus*. *Theor Appl Genet* 101:487-493.

Grivet L and Arruda P (2001) Sugarcane genomics: depicting the complex genome of an important tropical crop. *Curr Opin Plant Biol* 2:122-127.

Guimarães CT (1999) Mapeamento comparativo e detecção de QTLs em cana-de-açúcar utilizando marcadores moleculares. Viçosa. 70 p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Guimarães, CT, Sills GR and Sobral B (1997) Comparative mapping of Andropogoneae: *Saccharum* L. (sugarcane) and its relation to sorghum and maize. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:14261-14266.

Hoarau JY, Grivet L, Offmann B, Raboin LM, Diorflar JP, Payet J, Hellmann M, D'Hont and Glazsmann JC (2002) Genetic dissection of a modern cultivar (*Saccharum* spp.). II Detection of QTLs for yield components. *Theor Appl Genet* 105:1027-1037.

Hoarau JY, Offmann B, D'Hont A, Risterucci AM, Roques D, Glazsmann JC and Grivet L (2001) Genetic dissection of a modern sugar cane cultivar (*Saccharum* spp.) I. Genome mapping with AFLP markers. *Theor Appl Genet* 103:84-97.

Hospital F, Moreau L, Lacoudre F, Charcosset A and Gallais A (1997) More on the efficiency of marker-assisted selection. *Theor Appl Genet* 95:1181-1189.

Kido EA (2003) Mapeamento de marcadores moleculares AFLP em população derivada de clones elite de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) e suas associações com caracteres agrônômicos. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo.

Lande R and Thompson R (1990) Efficiency of marker-assisted selection in the improvement of quantitative traits. *Genetics* 124:185-199.

Lima MLA, Garcia AAF, Oliveira KM, Matsuoka KS, Arizono H, de Souza Jr CL and Souza AP (2002) Analysis of genetic similarity by AFLP and coefficient of parentage among genotypes of sugar cane (*Saccharum* spp.). *Theor Appl Genet* 104:30-38.

McIntyre CL, Hoarau JY, D'Hont A, Reffay N, Jackson PA, Aitken KS and Besse P (2005) Characterisation of genome regions incorporated from an important wild relative into Australian sugarcane. *Mol Breeding* 15:367-381.

Melo LJOT, Oliveira FJ, Bastos GQ, Filho CJA and Reis OV (2006) Interação Genótipo X ciclos de colheita de cana-de-açúcar da zona da mata norte de pernambuco. *Bragantia*, Campinas 65(2):197-205

Meza NA (2002) Construção de um mapa genético para híbridos interespecíficos de variedades comerciais de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) empregando-se marcadores moleculares do tipo RFLP. Dissertação (Mestrado) Campinas 102pp. – Universidade Estadual de Campinas.

Ming R, Liu SC, Lin YR., Da Silva J, Wilson W, Braga D, van Deynze A, Wenslaff T F, Wu KK, Moore PH, Burnquist W, Sorrells ME, Irvine JE and Paterson AH (1998) Detailed alignment of *Saccharum* and *Sorghum* chromosomes: comparative organization of closely related diploid and polyploid genomes. *Genetics* 150:1663-1682.

Ming R, Liu SC, Moore PH, Irvine JE and Paterson AH (2001) QTL analysis in a complex autopolyploid: genetic control of sugar content in sugarcane. *Genome Research* 11:2075-2084.

Ming R, Wang WY, Draye X, Moore PH, Irvine JE and Paterson AH (2002) Molecular dissection of complex traits in autopolyploids: mapping QTLs affecting sugar yields and related traits in sugarcane. *Theor Appl Genet* 105:332–345.

Mudje J, Anderson WR, Kehrer RL and Fairbanks DJ (1996) A RAPD genetic map of *Saccharum officinarum*. *Crop Science*, 36:1362-1366.

Oliveira, MAS (2003) A relação capital-trabalho na agroindústria sucroalcooleira paulista e a intensificação do corte mecanizado: gestão do trabalho e certificação ambiental. 2003. 226 f. Dissertação (Mestrado em Geografia) - Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista, Presidente Prudente.

Peccoud J, Vander Velden K, Podlich DW, Winkler CR, Arthur WL and Cooper M (2004) The selection values of alleles in a molecular network model are context dependent. *Genetics* 166:1715–1725.

Sills GR, Bridges W, Al Janabi S and Sobral BWS (1995) Genetic analysis of agronomic traits in a cross between sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) and its presumed progenitor (*S. Robustum* Brandes & Jesw. Ex.Grassl). *Mol breeding* 10:355-363.

Souza HMB (2003) Mapeamento genético de híbridos comerciais de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) utilizando marcadores moleculares do tipo microssatélite Tese (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura 'Luiz de Queiroz', Universidade de São Paulo. Piracicaba 98p.

Statsoft inc. STATISTICA for Windows. Tulsa, USA, 1999.

Wu KK, Burnquist W, Sorrells ME, Tew TL, Moore PH and Tanksley SD (1992) The detection and estimation of linkage in polyploids using single-dose restriction fragments. *Theor Appl Genet* 83:294-300.

TABELAS

Tabela 1. Marcadores AFLP (Progenie 234/96) com associação significativa (ANAVA, $p < 0,05$) com Fibra, em diferentes anos, tipo de dose (D), níveis de significância (p), coeficientes de determinação (R^2), e efeitos (%).

Marcador	D	Ano/Local	Ciclo	F	p	R^2	Efeito	QTL
ACGCAA12c	S	2000-Piracicaba	Planta	8,03	0,008016	0,18	-1,74	QTLp
		2001-Piracicaba	Soca	6,38	0,016856	0,14	-1,59	*
		2003-Piracicaba	Planta	8,42	0,006773	0,19	-1,83	QTLp
		2004-Piracicaba	Soca	5,29	0,028339	0,12	-1,03	*
		2004-Piracicaba	Planta	5,89	0,02124	0,13	-1,36	*
		2005-Jaú	Soca	6,86	0,013527	0,15	-1,45	QTLp
		2005-Piracicaba	Soca	9,61	0,004095	0,21	-1,75	QTL
AACCAT61c	S	2000-Piracicaba	Planta	4,87	0,035037	0,11	-2,29	*
		2001-Piracicaba	Soca	7,64	0,009663	0,18	-2,80	QTLp
		2003-Piracicaba	Planta	6,15	0,019015	0,14	-2,58	*
		2004-Piracicaba	Soca	6,75	0,014399	0,16	-1,85	QTLp
		2004-Jaú	Planta	5,13	0,030842	0,12	-2,02	*
		2005-Piracicaba	Soca	7,31	0,011181	0,17	-2,56	QTLp
		2000-Piracicaba	Planta	6,19	0,01934	0,16	-1,68	*
ACTCAC25c	M	2001-Piracicaba	Soca	6,29	0,018452	0,16	-1,69	*
		2003-Piracicaba	Planta	4,71	0,038956	0,12	-1,51	*
		2004-Piracicaba	Soca	5,44	0,027446	0,14	-1,08	*
		2005-Piracicaba	Soca	4,49	0,04333	0,11	-1,32	*
		2000-Piracicaba	Planta	4,54	0,039945	0,09	0,88	*
AGGCAG25b	S	2001-Piracicaba	Soca	7,14	0,01126	0,14	1,13	QTLp
		2004-Piracicaba	Soca	5,28	0,027485	0,10	0,74	*
		2004-Jaú	Planta	4,28	0,045784	0,08	0,73	*
		2004-Piracicaba	Planta	5,09	0,030181	0,10	0,74	*
		2005-Piracicaba	Soca	5,69	0,022409	0,11	0,92	*

D - Dose (S-simples; M-múltipla)

Efeito: Diferença entre grupos portadores e não portadores do marcador

QTLp: QTL presumível

F e p – níveis de significância

Tabela 2. Marcadores AFLP (Progenie 234/96) com associação significativa (ANAVA, $p < 0,05$) com PCC, em diferentes anos, tipo de dose (D), níveis de significância (p), coeficientes de determinação (R^2), e efeitos (%).

Marcador	D	Ano/Local	Ciclo	F	p	R^2	Efeito	QTL
AAGCTC10c	S	2000-Piracicaba	Planta	17,76	0,00047	0,46	1,78	QTL
		2001-Piracicaba	Soca	14,13	0,001328	0,4	1,52	QTL
		2003-Piracicaba	Planta	5,7	0,027476	0,19	1,27	*
		2004-Piracicaba	Soca	11,12	0,003485	0,34	1,21	QTL
		2004-Jaú	Planta	8,85	0,00778	0,28	1,04	QTLp
		2004-Piracicaba	Planta	12,35	0,002317	0,36	1,62	QTL
		2005-Jaú	Soca	4,74	0,042219	0,16	1	*
		2005-Piracicaba	Soca	5,97	0,024458	0,2	0,94	*
ACCCAG16b	S	2000-Piracicaba	Planta	10,18	0,003932	0,27	-1,41	QTL
		2001-Piracicaba	Soca	10,46	0,003531	0,27	-1,41	QTL
		2003-Piracicaba	Planta	21,72	0,000098	0,45	-1,25	QTL
		2004-Piracicaba	Soca	13,1	0,001369	0,33	-1,3	QTL
		2005-Jaú	Soca	4,81	0,03823	0,13	-1,04	*

D - Dose (S-simples; M-múltipla)

Efeito: Diferença entre grupos portadores e não portadores do marcador

QTLp: QTL presumível

F e p – níveis de significância

Tabela 3. Marcadores AFLP (Progenie 234/96), derivados de diferentes *iniciadores*, com associação significativa (ANAVA, $p < 0,05$) com TCH, em diferentes anos, tipo de dose (D), com seus níveis de significância (p), coeficientes de determinação (R^2), e efeitos ($t \cdot ha^{-1}$).

<i>Marcador</i>	<i>D</i>	<i>Ano/Local</i>	<i>Ciclo</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	<i>R²</i>	<i>Efeito</i>	<i>QTL</i>
AGGCAG40b	S	2003-Piracicaba	Planta	14	0,000642	0,26	15,65	QTL
		2004-Piracicaba	Soca	8,4	0,00623	0,17	15,95	QTLp
		2004-Jaú	Planta	4,6	0,039711	0,09	9,12	*
		2004-Piracicaba	Planta	13,1	0,000885	0,25	15,78	QTL
		2005-Jaú	Soca	9,9	0,003251	0,19	13,48	QTL
		2005-Piracicaba	Soca	6,5	0,015277	0,13	13,09	QTLp
ACTCAC20c	S	2000-Piracicaba	Planta	6,26	0,018742	0,16	-19,92	*
		2004-Piracicaba	Soca	6,38	0,0177	0,16	-16,33	*
		2005-Jaú	Soca	5,12	0,031959	0,13	-11,49	*
		2005-Piracicaba	Soca	6,94	0,013803	0,17	-16,31	QTLp

D - Dose (S-simples; M-múltipla)

Efeito: Diferença entre grupos portadores e não portadores do marcador

QTLp: QTL presumível

F e p – níveis de significância

Tabela 4. Marcadores PCR específicos (Progenie 234/96), com associação significativa (ANAVA, $p < 0,05$) com os caracteres, em diferentes anos, tipo de dose (D), com seus níveis de significância (p), coeficientes de determinação (R^2), e efeitos [Fibra e PCC em % e TCH em $t.ha^{-1}$].

Marcador	D	Caráter/Ano/Local	Ciclo	F	p	R ²	Efeito	QTL
M31.Cc	S	FIBRA2003-Pira	Planta	5,49	0,022662	0,07	-0,88	*
		FIBRA2004-Jaú	Planta	4,17	0,045676	0,05	-0,68	*
		FIBRA2004-Pira	Planta	4,24	0,043942	0,05	-0,63	*
		FIBRA2005-Jaú	Soca	5,99	0,017532	0,08	-0,77	*
		FIBRA2005-Pira	Soca	4,2	0,045	0,05	-0,75	*
M31.Da	S	FIBRA2000-Pira	Planta	4,83	0,032076	0,06	-0,81	*
		FIBRA2003-Pira	Planta	4,83	0,032036	0,06	-0,82	*
		FIBRA2004-Pira	Soca	4,43	0,039636	0,06	-0,63	*
		FIBRA2004-Pira	Planta	5,03	0,028745	0,07	-0,68	*
		FIBRA2004-Jaú	Planta	6,65	0,012504	0,09	-0,83	QTLp
		FIBRA2005-Pira	Soca	5,42	0,023516	0,07	-0,84	*
		TCH2001-Pira	Soca	4,2	0,045025	0,05	-14,22	*
		TCH2003-Pira	Planta	5,35	0,024346	0,07	-7,55	*
		TCH2004-Pira	Soca	5,26	0,025495	0,07	-9,56	*
		TCH2004-Pira	Planta	14,07	0,000413	0,18	-11,17	QTL
		TCH2005-Jaú	Soca	9,19	0,003649	0,12	-9,3	QTL
		TCH2005-Pira	Soca	8,74	0,004522	0,12	-11,55	QTL
		M31.Ec	S	FIBRA2000-Pira	Planta	7,56	0,007987	0,1
FIBRA2003-Pira	Planta			4,24	0,044035	0,05	-0,8	*
FIBRA2004-Jaú	Planta			6,2	0,015731	0,08	-0,83	*
FIBRA2004-Pira	Planta			5,59	0,021534	0,07	-0,73	*
FIBRA2005-Jaú	Soca			9,89	0,002636	0,13	-0,99	QTL
FIBRA2005-Pira	Soca			5,31	0,024818	0,07	-0,86	*
TCH2005-Jaú	Soca			4,87	0,031349	0,06	-7,21	*
PCC2004-Jaú	Planta			5,87	0,018621	0,08	0,73	*

D - Dose (S-simples; M-múltipla)

Efeito: Diferença entre grupos portadores e não portadores do marcador

QTLp: QTL presumível

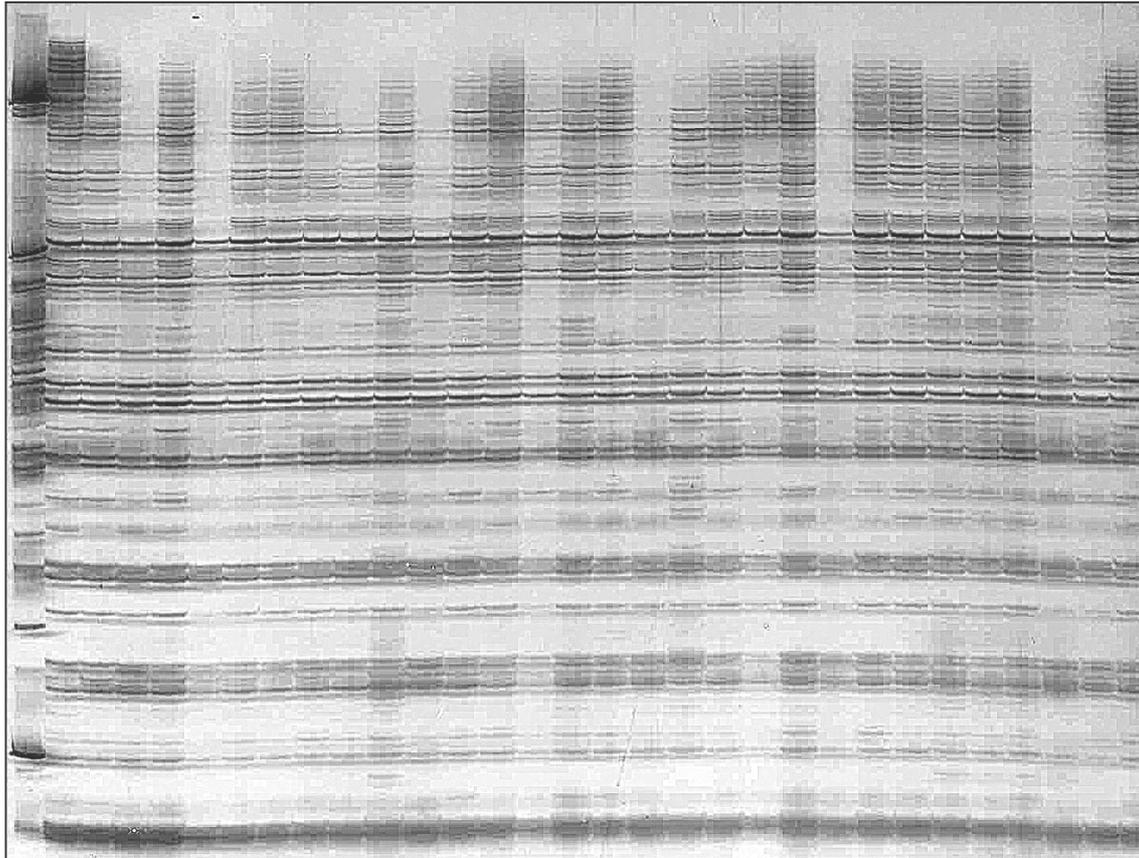
Pira- Piracicaba

F e p – níveis de significância

FIGURAS

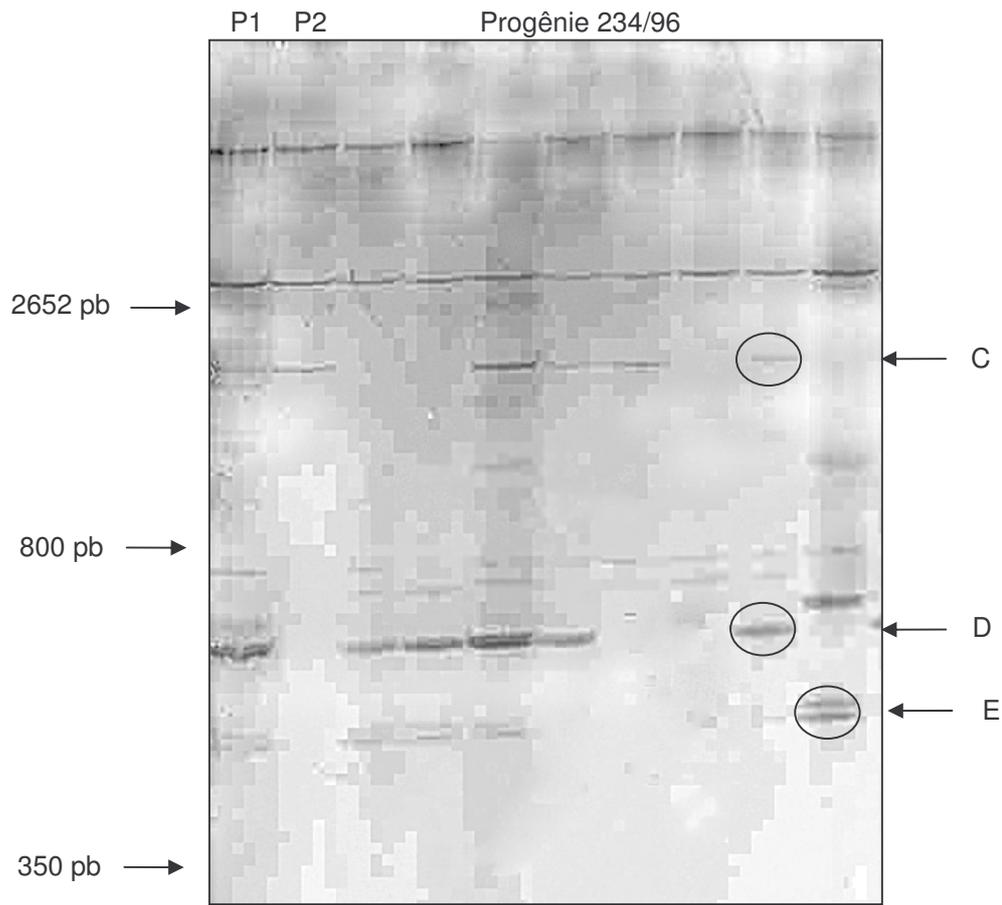
Figura 1. Gel Parcial AFLP (Progênie 234/96) gerado pela combinação de iniciadores E-AAC M-CAT.

L 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30



L- Ladder de 50 pb 1- Genitor SP80-180 2-Genitor SP80-4966 3 a 30 - Progênie

Figura 2. Gel Parcial, com indivíduos 234/96, sinalizando marcas derivadas do iniciador específico ACCCAG31 (C, D, E)



L- Ladder 50 pb; P1 – SP80-180; P2 – SP80- 4966;

6. Conclusões

A associação fenótipo – marcador na progênie 234/96 possibilitou a detecção de marcadores AFLP associados aos caracteres estudados, tanto de efeitos positivos quanto negativos. Para o caráter Fibra%Cana, o marcador mais promissor, com efeito positivo, ou seja que aumentaria o percentual de fibra foi AGGCAG25b; os de efeito negativo, que diminuiria Fibra% foram ACGCAA12c e AACCAT61c. Para o caráter PCC, os marcadores AAGCTC10c e ACCCAG16b são bons candidatos para uso futuro em seleção assistida, pois devido ao efeito positivo, eles contribuiriam com o aumento da produção de açúcares. Para o caráter TCH, o marcador AGGCAG40b foi considerado o mais promissor por seu efeito positivo.

Marcadores de efeito negativo para Fibra%Cana amplificados conjuntamente a partir dos iniciadores M31 (M31.Cc, M31.Da e M31.Ec) também foram considerados promissores. O marcador M31.Da, por apresentar também associação com TCH, mas de efeito negativo levaria a uma diminuição da tonelage de cana por hectare (TCH), o que não seria interessante, a não ser para exclusão dos materiais em melhoramento. A associação do marcador M31.Ec com o caráter Fibra%Cana em ensaios com duas progênies indica que ele pode ser útil na seleção assistida. Estudos desses marcadores com outros testes de campo e com outras populações são necessários para avaliar a estabilidade dos mesmos em diferentes ambientes e materiais.

7. Anexos

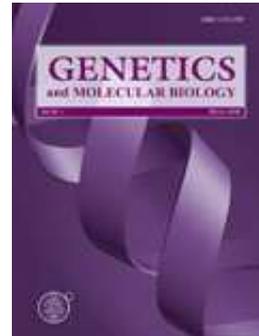
7.1. Instruções para Autores da Revista *Genetics and Molecular Biology*.

SUBMISSION OF PAPERS

1. Manuscripts should be submitted to:

Angela M. Vianna-Morgante , Editor-in-Chief
Genetics and Molecular Biology
Rua Capitão Adelmio Norberto da Silva, 736
14025-670 Ribeirão Preto, SP – Brasil

Print ISSN 1415-4757
Publication of the Sociedade Brasileira de Genética



2. A submission package sent to the Editorial Office must contain:

- a) A cover letter signed by all authors stating that they have approved the submission of the manuscript and that the findings have not been published or are not under consideration for publication elsewhere.
- b) A hard copy of the manuscript, including original figures.
- c) A copy of any unpublished or in-press companion articles referred to in the submission.
- d) An electronic copy of the text, tables and figures. Formats for text are Word or RTF, in Windows platform. Images in TIFF or JPEG formats should be sent in separate files (For Figures, see detailed instructions in 3.1.h). Mailed disks must be labeled with the first author's last name, platform and software (see detailed ins

3. Categories of Contribution

3.1. Research Articles

Manuscripts must be written in English in double-spaced, 12-point type throughout, including the References Cited section, appendices, tables and legends; printed on one side only of A4 paper with 2.5 cm margins; marked with consecutive page numbers, beginning with the cover page.

The following elements must start on a new page and be ordered as they are listed below:

- a) **The title page** must contain: a concise and informative title; the authors' names (first name at full length); the authors' institutional affiliation, including department, institution, city, state or province and country; different affiliations indicated with superscript numbers; a short running title of about 35 characters, including spaces; up to five key words; the corresponding author's name, postal address, phone and fax numbers and email address. The corresponding author is the person responsible for checking the page proofs, arranging for the payment of color illustrations and author's alteration charges.
- b) **The Abstract** must be a single paragraph that does not exceed 200 words and summarizes the main results and conclusions of the study. It should not contain references.
- c) **The text** must be as succinct as possible. *Text citations*: articles should be referred to by authors' surnames and date of publication; citations with two authors must include both names; in citations with three or more authors, name the first author and use *et al.* List two or more references in the same citation in chronological order, separated by semi-colons. When two or more works in a citation were published in the same year, list them alphabetically by the first author surname. For two or more works by the same author(s) in a citation, list them chronologically, with the years separated by commas. (Example: Freire-Maia *et al.*, 1966a, 1966b, 2000). Only articles that are published or in press should be cited. In the case of personal communications or unpublished

results, all contributors must be listed by initials and last name (*et al.* should not be used). **Numbers:** In the text, numbers nine or less must be written out except as part of a date, a fraction or decimal, a percentage, or a unit of measurement. Use Arabic numerals for numbers larger than nine. Avoid starting a sentence with a number. **Binomial Names:** Latin names of genera, species and intraspecific taxa in the text must be printed in italics; names of orders and families should appear in the Title and also when first mentioned in the text. URLs for programs, data or other sources should be listed in the Internet Resources Section, immediately after the References Section, not in the text. URLs for citations of publications in electronic journals should appear in the reference section.

The text includes the following elements:

Introduction – Description of the background that led to the study.

Material (or Subjects) and Methods – Details relevant to the conduct of the study. Statistical methods should be explained at the end of this section.

Results – Undue repetition in text and tables should be avoided. Comment on significance of results is appropriate but broader discussion should be part of the Discussion section.

Discussion – The findings of the study should be placed in context of relevant published data. Ideas presented in other publications should not be discussed solely to make an exhaustive presentation.

Some manuscripts may require different formats appropriate to their content.

d) The Acknowledgments must be a single paragraph that immediately follows the discussion and includes references to grant support.

e) The References Section: Section: references must be ordered alphabetically by the first author surname; references with the same first author should be ordered as follows: first, as single author in chronological order; next, with only one more co-author in alphabetical order by the second author; and finally followed by references with more than two co-authors, in chronological order, independent of the second author surnames. Use standard abbreviations for journal titles.

Only articles that are published or in press should be included in this section. Works submitted to a publication but not yet accepted, personal communications and unpublished data must be cited within the text. “Personal communication” refers to individuals other than the authors of the manuscript being submitted; “unpublished data” refers to data produced by at least one of the authors of the manuscript being submitted.

Sample journal article citation:

Breuer ME and Pavan C (1955) Behaviour of polytene *chromosomes* of *Rhynchosciara angelae* at different stages of larval development. *Chromosoma* 7:371-386.

Yonenaga-Yassuda Y, Rodrigues MT and Pellegrino KCM (2005) Chromosomal banding patterns in the eyelid-less microteiid lizard radiation: The X₁X₁X₂X₂:X₁X₂Y sex chromosome system in *Calyptommatius* and the karyotypes of *Psilophtalmus* and *Tretioscincus* (Squamata, Gymnophthalmidae). *Genet Mol Biol* 28:700-709.

Sample book citation:

Dobzhansky T (1951) *Genetics and Origin of Species*. 3rd edition. Columbia University Press, New York, 364 pp.

Sample chapter-in-book citation:

Crawford DC and Howard-Peebles PN (2005) Fragile X: From cytogenetics to molecular genetics. In Gersen SL and Keagle MB (eds) *The Principles of Clinical Cytogenetics*. 2nd edition. Humana Press, New Jersey, pp 495-513.

Sample Electronic Article citation:

Simin K, Wu H, Lu L, Pinkel D, Albertson D, Cardiff RD and Van Dyke T (2004) pRb inactivation in mammary cells reveals common mechanisms for tumor initiation and progression in divergent epithelia. *Plos Biol* 2:194-205. <http://www.plosbiology.org> .

f) Internet Resources Section

this section should contain a list of URLs referring to data presented in the text, software programs and other Internet resources used during data processing. When databases are cited, date of consultation must be stated.

Sample Internet Resource citation :

Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/OMIM> (September 4, 2005)

LEM Software, http://dir.niehs.nih.gov/dirbb/weinbergfiles/hybrid_design.htm

g) Tables each table must start on a new page. A concise title should be provided above the table. Tables must be numbered consecutively in Arabic numerals. Each column must have a title in the box head. Footnotes typed directly below the table should be indicated in lowercase superscript numbers.

h) Figures must be numbered consecutively in Arabic numerals. Legends should be typed on a separate sheet. A set of original illustrations of the highest quality must be provided in glossy paper. If you have created figures electronically submit them also as hard copies. Scanned figures should not be submitted. Images should be in TIFF or JPEG format and provided in separate files. Figures in Word format cannot be published. Journal quality reproduction will require grayscale and color at resolution yielding 300 dpi. Authors should submit bitmapped line art at resolution yielding 600-1200 dpi. These resolutions refer to the output size of the file; if it is anticipated that images will be enlarged or reduced, the resolutions should be adjusted accordingly. Identify each illustration by affixing on the back a label containing: the number of the figure, the name of the first author and an arrow indicating top of illustration. Illustrations supplied on disks must follow instructions in item 2 (Submission package). Color illustration can be accepted, but authors are asked to defray the cost. For costs of color figures, check with the Editorial Office.

i) Nomenclature should adhere to current international standards.

j) Sequences may appear in text or in figure. DNA, RNA and protein sequences equal to or greater than 50 units must be entered into public databases. The accession number must be provided and released to the general public together with publication of the article. Long sequences requiring more than two pages to reproduce will not be published unless the Editorial decision is that the publication is necessary. Complete mtDNA sequence will not be published.

k) Data access: reference should be made to availability of detailed data and materials used for reported studies.

l) Ethical issues: Reports of experiments on live vertebrates must include a brief statement that the institutional review board approved the work. For experiments involving human subjects, authors must also include a statement that informed consent was obtained from all subjects. If photos or any other identifiable data are included, a copy of the signed consent must accompany the manuscript.

3.2 Short Communications Present brief observations that do not warrant full-length articles. They should not be considered preliminary communications. They should be 15 or fewer typed pages in double spaced 12-point type, including literature cited. They should include an Abstract no longer than five percent of the paper's length and no further subdivision with introduction, material and methods, results and discussion in a single section. Up to two tables and two figures may be submitted. The title page and reference section format is that of full-length article.

3.3 Letters to the Editor Relate or respond to recent published items in the journal. Discussions of political, social and ethical issues of interest to geneticists are also welcome in this form.

3.4 Review Articles are welcome.

3.5 Book Reviews: Publishers are invited to submit books on Genetics, Evolution and related disciplines, for review in the journal. Aspiring reviewers may propose writing a review.

3.6 History, Story and Memories Accounts on historical aspects of Genetics relating to Brazil.

4. Proofs: Page proofs will be sent to the corresponding author. Changes made to page proofs, apart from printer's errors, will be charged to the authors. Notes added in proof require Editorial approval.

5. Reprints are free of charge and provided as a pdf-file.

7.2. Ensaios de Produção

Os dados abaixo foram fornecidos pelo Centro de Tecnologia Canavieira. As análises de variâncias conjunta dos dados dos ensaios, para a progênie 234/96 (CP - cana-planta e CS - cana-soca), CP2000 / CS2001 (dados não mostrados), CP2003, CS2004 (**Tabela 1**); CP2004, CS2005 (**Tabela 2**); CP2004, CS2005 - Jaú (**Tabela 3**); e para a progênie 187/97, CP2003 e CS2004 (**Tabela 4**), apresentaram significância, ao nível de 1% de probabilidade, para a fonte de variação “Híbridos ajustados” para os diferentes caracteres avaliados (TCH, PCC e Fibra%), evidenciando a existência de variabilidade entre os materiais em estudo. Os coeficientes de variação estimados em todos os ensaios indicaram bom controle experimental, permitindo que as diferenças entre os híbridos fossem detectadas nos estádios de cana-planta e cana-soca. Interações entre padrões e ensaios para os três caracteres não foram significativas, ao nível estudado, permitindo que as médias de híbridos dos diferentes experimentos fossem ajustadas e comparadas.

Tabela 1. Análise da variância parcial para Fibra%, PCC e TCH, referentes aos anos de 2003 e 2004 (cana-planta e cana-soca –Piracicaba) da progênie ‘SP80-180/SP80-4966’

‘SP80-180/SP80-4966’		CP2003-Pira			CS2004-Pira		
		TCH	PCC	Fibra	TCH	PCC	Fibra
Fonte de Variação	GL	F	F	F	F	F	F
Ensaios	8	13,94	5,37	8,45	7,48	11,83	5,86
Híbridos Ajustados	135	8,5	4,71	9,77	14,78	11,86	4,4
PadrõesXEnsaios	16	0,8	0,66	0,45	0,9	1,02	0,58
Resíduo	151						
		CV=13,62%	CV=4,90%	CV=5,75%	CV=12,70%	CV=3,25%	CV=7,88%

Fonte: Copersucar

Tabela 2. Análise da variância parcial para Fibra%, PCC e TCH, referentes aos anos de 2004 e 2005 (cana-planta e cana-soca –Piracicaba) da progênie ‘SP80-180/SP80-4966’

‘SP80-180/SP80-4966’		CP2004-Pira			CS2005-Pira		
		TCH	PCC	Fibra	TCH	PCC	Fibra
Fonte de Variação	GL	F	F	F	F	F	F
Ensaios	2	2,29	0	83,26	6,58	3,72	17,28
Híbridos Ajustados	105	23,09	9,25	19,1	25,22	17,21	23,29
PadrõesXEnsaios	6	0,51	1,22	1,07	0,54	0,56	0,84
Resíduo	111						
		CV=12,70%	CV=5,02%	CV=3,74%	CV=9,02%	CV=2,41%	CV=3,71%

Fonte: Copersucar

Tabela 3. Análise da variância parcial para Fibra%, PCC e TCH, referentes aos anos de 2004 e 2005 (cana-planta e cana-soca – Jaú) da progênie ‘SP80-180/SP80-4966’

‘SP80-180/SP80-4966’	GL	CP2004-Jaú			CS2005-Jaú		
		TCH	PCC	Fibra	TCH	PCC	Fibra
Fonte de Variação	GL	F	F	F	F	F	F
Ensaio	2	123,7	22,22	3,83	75,06	24,12	3,6
Híbridos Ajustados	105	8,25	8,03	17,14	16,14	11,75	13,97
PadrõesXEnsaio	6	1,41	0,99	0,96	0,98	0,34	0,91
Resíduo	111						
		CV=15,92%	CV=3,83%	CV=3,71%	CV=10,71%	CV=3,19%	CV=4,20%

Fonte: Copersucar

Tabela 4. Análise da variância parcial para Fibra%, PCC e TCH, referentes aos anos de 2003 e 2004 (cana-planta e cana-soca – Piracicaba) da progênie ‘SP85-7215 e SP80-144’

‘SP85-7215 e SP80-144’	GL	CP2003-Pira			CS2004-Pira		
		TCH	PCC	Fibra	TCH	PCC	Fibra
Fonte de Variação	GL	F	F	F	F	F	F
Ensaio	5	8,86	17,52	3,64	3,34	19,08	2,07
Híbridos Ajustados	122	8,25	8,54	9,69	11,82	10,99	12,84
PadrõesXEnsaio	10	0,84	0,72	0,95	2,02	0,97	0,99
Resíduo	132						
		CV=12,64%	CV=3,09%	CV=5,86%	CV=11,40%	CV=3,18%	CV=5,3%

Fonte: Copersucar

7.3. Dados Fenotípicos dos Ensaios de Produção

Os dados fenotípicos, relacionados com os caracteres agrônômicos, utilizados nesse trabalho para a progênie 234/96 e 187/97 foram gentilmente cedidos pela Copersucar, sendo mostrados a seguir nas **tabelas 5, 6 e 7**.

Tabela 5. Dados Fenotípicos (Progênie 234/96)

Híbridos	TCHa	PCCa	FIBRAa	TCHb	PCCb	FIBRAb	TCHc	PCCc	FIBRAc	TCHd	PCCd	FIBRAd
C001	89	15,0	8,9	73	15,9	8,9	76	15,9	9,8	85	14,7	9,1
C002	97	14,0	11,2	84	16,8	11,8	57	15,5	11,9	81	13,6	10,5
C003	71	14,9	12,4	69	16,0	12,9	59	16,0	14,2	70	14,7	12,2
C004	111	13,8	11,5	134	16,7	11,8	64	15,8	11,5	85	14,9	10,1
C005	56	16,1	8,7	59	17,6	9,2	32	17,2	9,9	51	15,5	9,6
C006	103	16,2	9,3	85	17,9	9,5	56	17,2	10,6	62	16,6	8,6
C007	79	14,1	11,8	63	15,0	10,8	41	15,9	12,1	56	13,8	10,4
C008	82	12,8	9,9	89	15,3	10,7	67	14,7	12,4	100	13,6	10,1
C009	89	11,0	9,9	98	13,7	10,2	67	13,6	10,3	89	12,3	9,2
C010	82	13,6	14,4	108	15,8	14,9	59	14,9	15,2	85	15,2	11,7
C011	80	16,3	11,6	71	18,0	11,4	41	18,4	11,7	64	16,9	11,5
C012	67	15,7	11,1	63	17,3	11,5	65	15,8	12,4	84	15,9	11,2
C013	113	13,3	11,8	117	14,1	12,4	52	15,1	11,8	89	14,5	10,8
C014	106	13,5	13,1	133	16,2	12,7	63	15,7	12,2	106	15,0	12,1
C015	109	13,0	10,2	108	15,7	11,1	58	15,4	12,3	79	14,9	9,9
C016	91	14,5	10,7	88	16,0	12,0	53	16,6	11,9	76	15,0	10,1
C018	77	14,9	11,5	65	16,4	12,2	61	15,0	13,0	67	15,6	11,5
C019	93	14,9	9,1	57	15,9	10,3	56	17,4	10,7	69	15,7	9,7
C020	115	12,2	12,2	129	14,6	12,9	73	14,1	13,5	100	13,3	12,0
C021	106	14,7	13,1	82	16,2	14,0	63	16,1	13,6	78	14,8	11,5
C022	94	14,4	11,2	100	16,6	11,8	59	16,6	12,5	85	15,5	10,9
C024	91	13,3	9,2	100	15,2	10,2	46	16,0	10,1	89	14,9	9,8
C026	109	14,5	10,1	111	15,8	10,8	53	16,2	9,6	84	15,0	10,1
C027	112	12,9	11,8	128	15,5	12,0	83	15,9	11,3	115	15,0	10,5
C028	103	14,7	10,5	117	16,8	11,2	58	17,4	11,2	91	16,3	9,6
C030	85	15,5	9,3	71	17,4	9,6	44	15,7	10,2	77	16,1	9,3
C032	85	13,2	10,7	84	16,3	10,7	68	17,0	12,5	93	14,6	9,8
C033	71	14,6	11,3	82	16,1	11,6	39	15,4	12,3	54	14,7	10,7
C034	121	11,6	15,2	120	13,8	15,0	54	14,3	16,4	95	13,6	12,7
C035	105	15,8	10,4	121	16,2	10,4	68	16,8	10,4	108	16,3	10,2
C036	111	14,9	11,2	99	16,1	10,6	68	16,9	11,1	90	15,4	10,0
C037	76	12,7	10,2	60	13,3	12,0	49	14,0	10,7	64	12,5	9,2
C038	77	10,9	8,6	73	12,7	9,4	57	14,4	10,7	82	11,9	9,2
C040	94	13,6	12,4	101	15,5	11,7	55	16,2	12,0	78	14,7	11,3
C041	100	13,3	8,7	60	13,0	8,4	69	15,8	9,8	74	13,4	8,3
C042	52	12,7	10,5	49	15,1	11,3	45	15,1	10,2	83	14,1	9,9
C043	113	12,2	13,5	98	13,9	13,4	55	14,8	13,0	99	13,7	11,4
C044	137	13,5	11,4	126	15,7	11,9	86	15,6	12,1	103	15,2	11,3
C045	75	15,7	10,8	70	17,5	11,7	43	17,4	12,4	74	16,6	10,7
C046	71	14,3	12,1	44	16,1	12,1	61	17,3	12,3	77	15,2	11,7

<i>Híbridos</i>	<i>TCHa</i>	<i>PCCa</i>	<i>FIBRAa</i>	<i>TCHb</i>	<i>PCCb</i>	<i>FIBRAb</i>	<i>TCHc</i>	<i>PCCc</i>	<i>FIBRAc</i>	<i>TCHd</i>	<i>PCCd</i>	Cont.
												<i>FIBRAd</i>
C047	101	12,4	11,7	90	13,8	12,0	67	13,5	13,9	99	13,1	12,5
C048	94	13,0	12,1	90	15,4	12,0	60	15,3	12,4	94	13,6	14,0
C049	108	12,3	10,8	110	14,9	11,9	62	14,1	11,6	70	13,8	10,8
C050	73	14,1	9,8	45	15,9	9,9	64	16,1	10,3	59	14,1	8,7
C051	83	15,5	9,1	83	18,0	9,0	50	18,1	9,3	73	16,2	9,2
C052	54	15,7	11,1	51	17,8	11,2	49	18,7	10,7	47	16,9	10,1
C053	77	12,8	10,1	77	15,8	10,9	52	15,5	11,5	74	13,7	9,5
C054	48	13,7	8,8	12	15,3	8,9	36	15,4	9,5	30	13,9	8,1
C055	107	13,0	10,3	125	15,7	11,3	90	14,7	11,8	80	13,0	10,2
C056	133	13,7	12,1	127	15,9	11,5	103	14,7	12,9	107	15,4	10,9
C057	75	14,1	8,8	31	15,0	9,0	58	16,2	10,1	61	14,4	8,3
C059	72	15,1	9,8	88	16,3	10,1	48	17,8	10,2	74	15,2	9,3
C061	80	13,9	9,0	98	16,9	9,3	64	16,9	11,0	90	14,6	11,0
C062	90	12,5	8,1	77	15,7	9,1	53	15,8	9,2	68	14,4	8,3
C063	104	14,8	13,5	86	16,5	14,1	29	15,4	13,8	40	15,3	12,7
C064	112	14,4	11,6	113	16,5	11,5	74	15,8	11,6	103	14,7	10,8
C065	102	14,9	10,9	117	16,7	9,9	59	16,8	12,8	80	16,0	11,0
C066	64	12,9	9,0	69	15,8	9,1	51	15,7	10,1	84	13,2	9,2
C067	73	15,9	9,0	69	17,5	9,5	55	17,0	9,9	60	15,7	9,1
C068	103	13,7	10,6	113	15,7	11,4	78	16,1	12,5	97	15,7	11,0
C070	63	15,7	8,6	43	17,4	9,6	59	17,4	10,4	69	16,2	9,7
C071	86	13,9	9,7	74	15,3	10,2	37	14,8	9,3	54	14,3	9,1
C072	56	14,8	9,6	55	16,5	9,9	46	16,7	9,9	63	15,7	9,8
C073	68	16,6	9,4	49	17,5	9,4	55	17,6	10,1	57	16,3	8,6
C074	69	15,9	8,9	87	17,4	8,9	58	17,0	9,5	67	16,6	8,0
C076	104	13,3	10,2	127	15,4	10,6	52	14,6	11,1	86	13,8	10,2
C077	120	13,5	9,8	85	15,2	9,2	87	15,4	11,2	87	14,3	9,9
C078	61	14,7	9,3	45	16,6	9,2	45	16,7	9,9	48	15,0	9,2
C079	47	13,0	11,5	52	15,1	11,8	36	11,3	10,5	44	13,2	9,6
C080	91	13,9	11,4	97	15,6	11,5	50	16,1	12,0	77	14,6	10,5
C081	82	15,4	11,7	77	16,3	11,2	45	16,0	12,5	60	15,1	10,5
C082	77	13,8	9,6	73	15,2	9,6	51	15,4	11,1	62	14,2	9,7
C084	73	13,0	11,5	47	14,0	11,5	69	14,6	11,9	82	12,3	10,9
C085	110	14,2	9,9	117	16,9	11,8	65	16,3	11,4	91	14,8	9,1
C086	89	11,4	14,3	103	15,0	14,3	53	13,3	16,5	105	13,8	13,3
C087	107	14,6	11,0	113	17,0	11,7	62	13,8	12,7	82	15,5	10,3
C088	67	13,9	11,1	50	14,8	11,1	14	13,7	11,8	30	12,5	9,9
C089	75	14,0	10,8	60	15,6	12,0	48	16,1	12,9	76	14,7	11,4
C091	76	14,0	10,4	93	16,4	10,4	48	15,1	13,2	86	14,6	10,6
C093	101	14,4	10,3	102	15,9	11,0	62	17,2	10,6	93	15,4	10,6
C094	77	13,4	10,9	91	16,1	11,3	65	16,0	13,2	92	14,4	12,1
C095	77	14,8	10,8	87	16,7	11,7	42	16,7	13,5	71	15,7	11,1
C096	90	13,2	9,1	89	15,6	9,3	60	15,1	10,6	65	14,5	9,0
C097	81	15,1	10,6	69	14,9	10,9	50	16,4	10,6	64	14,2	9,4
C099	86	13,0	11,5	88	15,9	11,4	57	15,0	12,8	59	13,6	10,4

a. cana-planta (2000, Piracicaba); b. cana-soca (2001; Piracicaba); c. cana-planta (2003, Piracicaba); d. cana-soca (2004, Piracicaba)

Tabela 6. Dados Fenotípicos Progenie 234/96

Híbridos	TCHe	PCCe	FIBRAe	TCHf	PCCf	FIBRAf	TCHg	PCCg	FIBRAg	TCHh	PCCh	FIBRAh
C001	53	13,7	9,7	69	15,0	10,0	51	16,0	10,3	57	17,3	9,9
C002	55	12,2	9,8	71	14,7	11,2	47	15,1	11,7	51	15,8	11,0
C003	46	11,9	9,6	75	15,0	11,6	33	13,9	11,6	48	15,2	11,6
C004	53	13,0	10,4	76	15,3	11,7	49	15,7	12,0	67	16,3	11,7
C005	26	13,7	9,4	49	16,7	10,0	38	16,8	9,9	45	18,0	10,2
C006	47	14,9	9,3	58	16,8	9,6	29	17,2	9,8	38	19,4	9,8
C007	24	12,7	11,1	47	15,1	12,0	42	15,3	12,1	53	16,0	11,6
C008	39	11,6	10,6	68	14,5	11,3	50	13,8	11,8	61	15,4	10,8
C009	33	11,7	9,2	73	13,5	10,0	40	12,9	9,6	57	15,3	10,7
C010	49	12,0	13,1	81	14,2	15,7	48	14,6	14,3	62	16,3	15,2
C011	32	15,2	11,1	62	16,7	11,7	33	16,7	12,0	48	18,8	11,5
C012	43	13,0	10,6	63	16,1	12,0	32	16,2	11,3	40	18,0	12,3
C013	37	10,5	10,2	81	14,3	11,5	40	14,6	11,7	55	15,0	11,4
C014	56	11,4	11,3	83	14,1	13,1	41	13,2	12,2	68	15,3	12,4
C015	35	13,5	9,9	67	15,3	10,7	37	15,0	12,1	55	16,0	11,4
C016	33	10,6	10,4	73	14,5	11,6	31	13,4	12,4	52	17,3	12,3
C017	17	13,0	9,3	31	15,0	10,2	32	14,4	10,1	30	16,1	9,7
C018	30	12,5	10,2	63	15,4	12,1	39	15,5	11,0	47	16,4	11,9
C019	48	13,9	9,4	68	16,3	10,3	42	17,1	10,6	55	17,1	9,8
C020	64	10,1	12,2	96	13,9	13,7	53	14,0	12,9	65	14,8	12,2
C021	40	14,4	11,4	75	15,6	12,9	54	14,3	13,0	61	15,8	12,5
C022	67	12,5	10,9	85	15,7	11,1	47	15,4	12,5	60	17,0	11,8
C023	9	16,4	9,4	19	16,7	9,8	18	16,4	9,8	26	18,4	11,2
C024	22	13,0	9,1	42	15,6	9,7	10	14,4	9,7	34	17,4	9,2
C025	4	15,2	8,8	7	15,7	11,0	7	14,5	9,5	3	19,3	9,6
C026	53	13,1	9,7	72	15,5	10,5	49	15,8	9,8	55	16,1	9,9
C027	71	11,9	10,2	102	15,0	11,1	57	15,6	11,5	69	15,7	10,5
C028	43	12,5	10,7	68	15,8	11,3	37	14,4	11,8	57	16,1	10,6
C029	16	11,5	9,1	41	14,5	9,3	34	14,4	9,6	34	16,4	10,2
C030	25	12,3	9,7	49	16,1	10,3	24	14,7	9,9	40	19,1	10,8
C031	12	13,2	9,1	23	15,7	9,4	28	14,8	9,1	31	17,9	10,7
C032	39	11,2	9,4	71	14,6	10,7	40	15,4	10,6	55	16,2	10,7
C033	24	13,5	11,2	47	14,8	11,4	42	15,4	11,7	47	17,4	10,7
C034	54	9,5	14,5	89	13,8	15,6	43	15,3	15,4	69	14,9	14,8
C035	48	14,7	9,3	85	17,0	10,8	42	16,2	11,1	64	18,4	10,7
C036	47	13,2	9,7	75	15,9	10,8	44	16,0	10,7	61	18,0	10,6
C037	22	13,2	9,2	52	14,4	10,9	26	15,5	10,6	34	15,9	10,3
C038	37	10,1	9,8	76	12,2	10,3	33	13,9	10,5	52	13,9	10,5
C039	51	11,2	11,7				64	13,8	11,6			
C040	43	11,3	11,2	74	14,3	12,0	30	14,7	11,6	52	16,6	12,3
C041	40	12,1	7,8	71	14,9	8,7	29	14,5	9,4	58	16,7	10,2
C042	28	10,7	9,3	59	15,2	10,4	37	13,6	11,1	48	16,4	10,6
C043	43	10,8	11,9	77	13,6	13,0	51	13,8	13,0	65	14,6	13,6
C044	55	13,1	9,8	89	15,6	11,0	60	14,3	12,2	77	16,6	11,8
C045	43	14,0	10,5	72	16,6	11,6	34	17,7	10,8	38	18,4	11,0
C046	42	14,2	12,3	73	15,7	12,8	45	14,7	14,1	61	17,3	13,0
C047	53	11,1	12,9	77	12,7	13,9	55	12,5	13,9	78	14,8	13,5
C048	41	12,0	11,4	82	14,4	12,8	47	14,7	13,2	55	15,8	12,5

Híbridos	Cont.											
	TCHe	PCCe	FIBRAe	TCHf	PCCf	FIBRAf	TCHg	PCCg	FIBRAg	TCHh	PCCh	FIBRAh
C049	14	11,1	10,3	35	15,1	11,7	22	11,8	10,9	45	16,0	12,6
C050	42	13,0	9,7	66	14,7	10,1	38	15,1	10,5	40	16,4	10,5
C051	35	13,1	9,4	54	17,2	9,8	29	16,2	10,1	46	18,3	10,9
C052	22	15,3	9,9	37	17,0	10,2	25	16,6	11,4	32	18,5	11,3
C053	32	12,7	10,1	73	15,9	11,1	33	15,7	11,0	52	16,5	11,0
C054	23	14,1	9,1	37	15,4	8,9	39	15,5	10,4	36	17,2	10,6
C055	51	12,2	10,1	81	14,3	11,2	52	14,8	11,1	64	17,4	11,2
C056	61	13,0	11,4	94	15,8	11,9	35	17,4	12,1	70	17,2	12,0
C057	40	11,8	8,6	56	15,6	8,8	36	15,3	10,0	36	15,8	8,5
C058	8	11,0	8,3	33	15,1	8,9	13	13,9	9,6	30	16,4	9,8
C059	31	13,3	9,4	61	16,2	9,8	24	15,4	10,3	42	18,9	9,9
C060	23	13,7	9,2	46	15,6	9,8	41	16,5	9,5	31	17,9	10,3
C061	44	13,2	10,3	74	16,0	10,8	40	14,5	10,6	62	18,3	10,7
C062	39	12,1	9,0	68	14,8	9,3	35	14,0	9,3	48	15,3	9,5
C063	19	12,0	10,4	37	14,6	12,8	15	15,4	13,1	31	17,0	13,5
C064	53	13,7	11,2	83	14,9	11,9	49	15,3	11,8	66	16,7	12,0
C065	54	11,0	9,9	77	16,4	11,0	42	14,9	11,3	73	17,8	11,0
C066	32	11,1	8,9	60	14,9	9,3	20	14,3	10,2	37	15,5	9,7
C067	34	13,6	9,1	46	16,1	9,5	34	16,0	9,7	40	17,9	9,7
C068	50	10,4	10,3	94	14,7	11,5	40	14,5	11,9	76	15,3	10,7
C069	14	13,0	9,9	28	15,5	10,5	29	15,4	10,7	30	16,8	11,2
C070	28	13,9	8,6	44	15,8	9,9	20	16,4	9,9	29	18,3	9,8
C071	22	12,7	9,0	41	14,2	9,5	33	14,8	10,4	29	16,6	11,2
C072	21	13,7	10,3	42	15,4	10,3	21	15,9	9,8	28	16,2	11,1
C073	36	14,7	9,7	47	16,9	9,6	29	16,6	10,4	36	18,8	10,8
C074	40	13,0	8,0	62	16,9	9,0	31	16,8	9,9	50	18,9	9,1
C075	31	13,0	10,2	58	15,2	10,8	28	15,6	10,6	42	18,1	11,5
C076	38	11,1	9,2	82	15,2	10,5	47	13,7	9,7	67	15,8	11,0
C077	65	12,9	10,1	78	15,5	11,1	78	14,3	10,2	87	15,7	11,5
C078	39	13,5	9,8	63	16,2	11,0	42	15,2	10,6	56	17,7	10,0
C079	48	12,8	12,6	70	15,1	13,0	53	14,6	12,9	71	17,1	14,7
C080	32	12,2	9,9	55	14,8	10,9	42	15,0	12,1	45	16,4	12,4
C081	20	13,8	11,3	46	15,6	12,4	35	15,4	12,0	48	18,3	12,2
C082	32	12,4	9,7	56	14,9	10,2	39	14,8	11,1	44	16,4	10,6
C083	6	13,7	10,3	25	16,2	11,3	23	15,7	11,5	28	18,9	11,5
C084	48	10,7	10,5	60	13,5	12,3	44	14,6	12,3	46	15,3	12,1
C085	55	12,6	9,6	68	16,1	10,7	51	15,6	11,8	66	17,5	11,1
C086	42	10,3	12,0	71	13,3	14,6	40	13,7	13,8	60	14,3	13,3
C087	27	13,3	10,7	51	15,8	11,5	44	15,1	11,8	52	16,2	11,9
C088	7	13,6	9,7	31	14,7	11,1	23	13,6	10,3	37	17,5	12,7
C089	45	11,9	11,3	67	14,9	11,7	34	13,3	12,0	55	17,0	13,4
C090	21	14,1	9,5	36	15,7	10,5	25	14,9	10,6	26	17,4	10,8
C091	45	11,4	13,0	77	13,6	14,3	37	16,1	12,8	50	17,0	12,8
C092	35	11,2	11,7	58	14,7	12,8	37	14,8	13,1	41	16,0	13,2
C093	52	12,4	10,0	79	14,7	10,8	57	14,4	11,4	59	15,5	11,1
C094	32	10,8	10,4	69	14,2	13,1	31	15,1	11,8	46	16,0	12,7
C095	36	11,8	10,7	63	15,1	12,9	38	14,6	12,0	49	16,6	11,9
C096	45	12,7	8,8	78	14,7	10,0	43	15,0	10,8	57	16,9	10,9

												Cont.
C097	37	13,1	9,4	47	14,4	9,9	43	16,2	11,2	47	17,3	10,2
C099	29	11,4	10,8	68	14,1	12,0	39	13,9	11,5	46	16,6	12,1
C100	35	14,4	8,2	54	16,9	8,9	30	16,6	9,1	37	18,3	9,2

e. cana-planta (2004, Piracicaba); f. cana-soca (2005; Piracicaba); g. cana-planta (2004, Jaú); h. cana-soca (2005, Jaú)

Tabela 7. Dados Fenotípicos Progenie 187/97

Híbridos	TCHc	PCCc	FIBRAc	TCHd	PCCd	FIBRAd
1	50	15,8	11	52	14,1	9,4
2	44	15,2	11	66	14,2	10
3	31	14	15,3	59	13,6	12,8
4	43	16,6	10,6	34	15,5	10,1
6	48	15,5	13,4	67	14,8	12,3
7	53	15,4	13,3	65	14,8	11,4
8	52	15,9	9,5	69	15,2	9,1
9	39	16,2	10,6	39	15,5	10,1
11	57	16,6	13,7	59	16,5	12,1
12	59	17,2	12,1	76	16,9	10,6
13	63	15,3	10	81	13,8	9,5
14	32	16,2	11,5	37	15,6	10,8
15	58	15,6	13,2	70	13,6	12,7
16	54	15,2	10,4	67	14,2	9,4
17	52	15,8	12,3	63	15,4	11,5
18	59	16,4	11,3	85	16,3	10,7
19	51	16,5	11	65	15,9	10,3
20	70	16,7	12,8	84	16	11,5
21	44	16,4	11,1	64	15,2	9,3
22	57	15	11,2	74	13,2	9,6
23	48	16,2	12,4	58	16	12,8
24	44	15,9	9,2	43	14,7	9
25	66	16,3	11,5	82	15,2	11,8
26	48	15,7	12,3	59	15,1	10,4
27	45	15,3	11,7	46	15	10,2
28	50	15,5	11,4	67	14,8	9,4
29	31	16,7	11,6	43	15,5	10,3
30	37	14,6	14,4	55	13,8	12,1

c. cana-planta (2003, Piracicaba); d. cana-soca (2004, Piracicaba)

7.4. Planilhas de Dígitos Binários

As planilhas de presença (1) ou ausência (0) de bandas polimórficas geradas com as onze combinações de iniciadores tipo AFLP testados na progênie 234/96 e para iniciadores específicos testados nas progênies 234/96 e 187/97 são dadas a seguir.

Planilha 1. Dados relativos a 234/96 com Iniciadores E - ACC / M - CAG

Híbridos	ACCCAG16	ACCCAG26	ACCCAG34
C001	1	1	1
C002	1	1	1
C003	1	1	0
C004	1	0	1
C020	1	0	1
C021	0	0	1
C024	1	1	1
C027	1	1	1
C030	0	0	1
C032	0	1	0
C034	1	1	0
C035	0	1	1
C036	0	0	0
C037	1	0	1
C038	1	1	0
C040	0	1	0
C041	1	0	1
C042	1	1	1
C044	1	1	1
C045	0	1	0
C057	0	0	0
C062	0	0	0
C064	0	0	0
C065	0	0	1
C067	0	0	1
C071	1	0	1

Planilha 2. Dados relativos a 234/96 com Iniciadores E - AGC / M - CAT

Híbridos	AGCCAT20	AGCCAT23	AGCCAT26	AGCCAT27
C001	1	1	0	1
C002	1	1	0	1
C003	1	0	1	1
C004	1	1	0	0
C020	1	1	1	1
C021	1	1	1	1
C024	1	0	1	1
C027	1	1	1	1
C030	0	1	0	1
C033	1	1	0	1
C034	1	1	1	0
C035	1	0	1	1
C036	1	1	1	1
C037	1	1	1	1
C038	1	1	1	0
C041	1	1	1	0
C042	1	1	1	1
C044	1	1	1	1
C045	1	1	1	1
C065	1	1	0	0
C067	1	1	1	0
C071	1	1	0	0

Planilha 3. Dados relativos a 234/96 com Iniciadores E - ACA / M - CTT

Híbridos	ACACTT17	ACACTT32
C020	1	1
C021	1	1
C022	1	1
C023	1	1
C024	1	1
C044	1	1
C059	1	0
C063	0	0
C064	0	0
C067	1	1
C071	1	1
C074	1	1
C079	1	1
C083	1	1
C089	0	0
C091	0	0
C092	0	0
C094	0	0
C096	0	0
C100	0	0

Planilha 4. Dados relativos a 234/96 com Iniciadores E - AAG / M – CTC

Híbridos	AAGCTC10	AAGCTC13
C001	1	0
C002	1	1
C003	0	0
C005	1	0
C010	1	1
C020	0	1
C021	1	1
C022	0	1
C024	0	1
C034	0	1
C041	0	1
C063	1	1
C064	1	0
C066	0	1
C067	1	0
C071	0	1
C073	1	0
C074	1	1
C079	0	1
C091	0	1
C099	0	0

Planilha 5. Dados relativos a 234/96 com Iniciadores E - ACT / M - CAC

Híbridos	ACTCAC14	ACTCAC16	ACTCAC18	ACTCAC20	ACTCAC22	ACTCAC25	ACTCAC35	ACTCAC43	ACTCAC48
C001	1	1	0	1	1	1	1	1	1
C002	0	1	1	0	1	1	1	1	1
C004	0	1	0	1	1	0	1	0	1
C021	0	1	1	0	1	1	1	1	1
C022	1	1	0	1	1	1	1	1	1
C024	1	1	1	1	0	1	1	1	1
C026	1	1	0	0	1	1	1	1	1
C027	1	0	0	1	1	1	1	0	1
C030	0	1	0	1	1	1	1	1	0
C033	1	1	1	1	1	0	1	1	1
C034	0	0	0	0	1	0	0	0	1
C035	1	1	1	0	1	1	1	1	0
C036	0	1	0	0	1	1	1	1	1
C037	0	1	1	1	1	1	1	1	0
C038	0	1	0	0	0	1	1	0	1
C040	1	1	1	1	1	1	1	0	0
C041	0	1	0	0	1	1	1	1	1
C042	1	1	0	0	1	0	1	1	0
C044	0	1	0	0	1	0	1	0	0
C045	1	1	0	1	1	1	1	1	0
C065	0	0	1	1	1	1	1	1	1
C067	1	1	0	1	1	1	1	1	1
C070	0	0	1	1	0	1	0	0	1
C072	1	0	1	1	0	1	1	1	1
C073	1	1	1	1	1	1	1	0	1
C074	1	0	0	1	1	1	0	1	1
C079	0	0	0	1	1	1	1	0	1
C087	1	1	0	1	1	1	1	1	1
C088	0	1	1	1	1	1	1	0	1

Planilha 6. Iniciadores PCR específicos - Progenie 234/96

Híbridos	MC	MD	ME	MG
1	1	0	0	1
2	1	0	0	1
3	1	0	0	1
4	0	0	0	1
5	1	1	1	1
6	0	1	1	1
7	0	1	1	1
8	1	1	1	0
9	1	1	0	1
10	0	0	0	1
11	1	0	0	1
12	0	0	1	1
13	1	1	1	0
15	0	0	1	1
16	0	1	1	1
18	1	1	1	1
19	1	0	1	1
20	1	0	1	1
21	0	1	0	1
22	1	1	1	1
24	1	1	1	0
26	1	0	1	1
27	1	0	1	1
28	1	0	0	0
30	1	0	1	1
32	1	1	1	1
33	0	1	1	1
34	0	0	0	1
35	1	1	1	0
36	0	0	1	0
37	1	1	1	0
38	0	0	1	1
40	1	0	0	1
41	0	1	0	1

				cont
Híbridos	MC	MD	ME	MG
42	1	0	1	1
43	1	1	0	0
45	0	1	1	1
46	0	0	0	1
47	0	0	0	1
48	1	1	1	1
49	0	1	0	1
50	1	1	0	1
51	1	1	1	1
52	1	0	1	1
53	1	1	0	0
54	1	1	0	1
55	1	0	1	1
56	0	0	1	1
57	1	1	1	1
59	1	1	0	0
61	0	1	1	0
64	0	1	0	1
65	0	0	0	1
66	1	0	1	1
67	0	1	1	1
68	0	0	1	1
70	0	1	1	1
71	0	1	1	1
72	1	1	1	1

Planilha 7. Iniciadores PCR específicos - Progenie 187/97

Híbridos	MC	MD	ME
1	0	1	1
2	0	1	1
3	0	0	0
4	0	1	1
6	0	1	1
7	0	1	0
8	1	1	1
9	1	1	0
11	0	1	0
12	0	1	0
13	1	1	1
14	1	1	1
15	1	1	1
16	1	1	1
17	1	1	1
18	0	1	1
19	0	1	1
20	1	1	1
21	0	1	1
22	0	1	1
23	1	1	1
24	1	0	1
25	1	1	1
26	1	1	1
27	1	1	1
28	1	1	1
29	1	1	1
30	0	1	1

Planilha 8. Dados relativos a 234/96 com Iniciadores E - ACG / M - CAA

Híbridos	ACGCAA12	ACGCAA14	ACGCAA15	ACGCAA28	ACGCAA29	ACGCAA32	ACGCAA33	ACGCAA34	ACGCAA35	ACGCAA37	ACGCAA44	ACGCAA48
C001	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0
C002	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0
C004	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
C020	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0
C021	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0
C022	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0	1	1
C024	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
C026	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1
C027	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1
C030	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1
C033	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	0
C034	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0
C035	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0
C036	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1
C037	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1
C038	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0
C040	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
C041	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1
C042	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0
C044	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0
C045	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0
C056	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
C065	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1
C066	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1
C067	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1
C070	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1
C071	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1
C073	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
C074	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1
C078	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1

												cont
Híbridos	ACGCAA12	ACGCAA14	ACGCAA15	ACGCAA28	ACGCAA29	ACGCAA32	ACGCAA33	ACGCAA34	ACGCAA35	ACGCAA37	ACGCAA44	ACGCAA48
C079	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	1
C087	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1
C088	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0	1

Planilha 9. Dados relativos a 234/96 com Inicializadores E - AGC / M - CAG

Híbridos	AGCCAG6	AGCCAG12	AGCCAG16	AGCCAG23	AGCCAG24	AGCCAG31	AGCCAG34	AGCCAG38	AGCCAG45	AGCCAG48
C001	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1
C002	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1
C003	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0
C004	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1
C020	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1
C021	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1
C022	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1
C024	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1
C026	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1
C027	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1
C030	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1
C033	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1
C034	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1
C035	0	1	1	0	1	1	1	0	0	1
C036	0	1	1	0	0	1	0	1	1	1
C037	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1
C038	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1
C040	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1
C041	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1
C042	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1
C044	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1
C045	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1
C065	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
C066	1	0	1	1	0	1	0	0	0	1

										Cont.
Híbridos	AGCCAG6	AGCCAG12	AGCCAG16	AGCCAG23	AGCCAG24	AGCCAG31	AGCCAG34	AGCCAG38	AGCCAG45	AGCCAG48
C067	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1
C071	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0
C073	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1
C074	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1
C079	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1
C088	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1

Planilha 10. Dados relativos a 234/96 com Iniciadores E - AAC / M - CAT

Híbridos	AACCAT41	AACCAT43	AACCAT45	AACCAT46	AACCAT49	AACCAT60	AACCAT61	AACCAT67	AACCAT70	AACCAT72	AACCAT79
C001	0	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0
C002	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1
C004	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0
C020	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0	1
C021	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0
C022	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1
C024	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1
C026	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1
C027	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0
C030	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0
C033	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1
C034	0	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0
C035	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1
C036	0	1	0	1	0	1	1	0	1	0	1
C037	0	0	1	1	0	1	1	0	0	1	0
C038	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
C040	0	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1
C041	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0

											Cont.
Híbridos	AACCAT41	AACCAT43	AACCAT45	AACCAT46	AACCAT49	AACCAT60	AACCAT61	AACCAT67	AACCAT70	AACCAT72	AACCAT79
C042	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1
C044	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1
C045	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1
C065	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1
C066	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1
C067	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1
C070	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1
C071	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0
C072	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0
C073	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1
C074	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1
C078	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1
C079	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1
C088	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1

Planilha 11. Dados relativos a 234/96 com Iniciadores E - ACA / M - CAC

Híbridos	ACACAC30	ACACAC33	ACACAC35	ACACAC37	ACACAC38	ACACAC44	ACACAC45	ACACAC47	ACACAC48	ACACAC49	ACACAC59
C001	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1
C002	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0
C004	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1
C020	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1
C021	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1
C022	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1
C024	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0
C026	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0
C027	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1
C030	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
C033	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
C034	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1
C035	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0
C036	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1
C037	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1
C038	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1
C040	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1
C041	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1
C042	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1
C044	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0
C065	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1
C066	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1
C067	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1
C070	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1
C071	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1
C073	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1
C074	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1
C078	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1
C079	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1
C088	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1

Planilha 12. Dados relativos a 234/96 com Iniciadores E - AGG / M - CAG

Híbridos	AGGCAG3	AGGCAG5	AGGCAG8	AGGCAG9	AGGCAG11	AGGCAG12	AGGCAG23	AGGCAG25	AGGCAG27	AGGCAG28	AGGCAG37	AGGCAG38	AGGCAG40	AGGCAG44	AGGCAG46	AGGCAG60	AGGCAG67
C001	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0
C002	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
C004	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1
C016	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1
C020	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1
C021	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1
C022	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1
C024	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1
C026	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1
C027	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
C030	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1
C033	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1
C035	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0	1
C036	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1
C037	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1
C038	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1
C040	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
C041	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1
C042	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1
C044	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1
C045	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1
C065	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1
C066	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0
C067	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1
C070	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1
C071	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1
C072	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
C073	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1
C074	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
C077	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1

																	Cont
Híbridos	AGGCAG3	AGGCAG5	AGGCAG8	AGGCAG9	AGGCAG11	AGGCAG12	AGGCAG23	AGGCAG25	AGGCAG27	AGGCAG28	AGGCAG37	AGGCAG38	AGGCAG40	AGGCAG44	AGGCAG46	AGGCAG60	AGGCAG67
C078	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1
C079	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
C081	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1
C084	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1
C085	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1
C086	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
C087	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
C088	0	1	1	0	1	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1

Planilha 13. Dados relativos a 234/96 com Iniciadores E - AGG / M - CAC

Híbridos	AGGCAC7	AGGCAC10	AGGCAC13	AGGCAC15	AGGCAC17	AGGCAC18	AGGCAC27	AGGCAC31	AGGCAC42	AGGCAC45
C001	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1
C002	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1
C004	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1
C016	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1
C020	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1
C021	0	1	0	1	1	0	1	0	1	1
C022	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1
C024	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1
C026	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1
C027	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0
C030	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1
C033	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1
C035	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1
C036	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1
C037	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
C038	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1
C040	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1
C041	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1
C042	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
C044	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1
C045	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
C065	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1
C066	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1
C067	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
C070	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0
C071	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1
C072	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
C073	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1
C074	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1
C077	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1

										Cont.
Híbridos	AGGCAC7	AGGCAC10	AGGCAC13	AGGCAC15	AGGCAC17	AGGCAC18	AGGCAC27	AGGCAC31	AGGCAC42	AGGCAC45
C078	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1
C079	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1
C081	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
C084	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1
C085	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
C086	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1
C087	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1
C088	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1

