



Mapeamento genético da CANA-DE-AÇÚCAR

Uso de marcadores moleculares no mapeamento genético visando o melhoramento da cana-de-açúcar

Janaína de Cássia Albino

MSc., estudante de pós-graduação
Centro de Energia Nuclear na Agricultura
Universidade de São Paulo

Silvana Creste

DSc., Pesquisadora, Centro de Cana
Instituto Agronômico de Campinas

Antonio Figueira

PbD, Professor Associado
Centro de Energia Nuclear na Agricultura
Universidade de São Paulo
figueira@cena.usp.br

Imagens cedidas pelos autores

Introdução

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) é uma das principais culturas do Brasil, sendo o agronegócio sucroalcooleiro responsável por 2,4% do PIB nacional (www.jornalcana.com.br). Este setor é também um dos que mais empregam no país, com a geração de 3,6 milhões de empregos diretos e indiretos, além de congregarem mais de 72.000 agricultores e 334 usinas (www.jornalcana.com.br). O Brasil é o maior produtor mundial de açúcar, obtendo 24 milhões de toneladas ano⁻¹, das quais cerca de 60% são exportadas. Há perspectivas para aumento das exportações do açúcar brasileiro, motivado principalmente pela redução aos subsídios praticados pela União Européia à produção de açúcar de beterraba, e pelo aumento do consumo de produtos industrializados que utilizam o açúcar como matéria-prima. A produção brasileira de etanol também é a maior do mundo, com 14 bilhões de litros de álcool ano⁻¹, devido a utilização em larga escala no Brasil do etanol como combustível renovável e alternativo ao petróleo. Hoje o álcool é reconhecido mundialmente pelas suas vantagens ambientais, sociais e econômicas e diversos países têm demonstrado interesse crescente na tecnologia brasileira. Estima-se que com os carros bi-combustíveis, a demanda interna de etanol combustível será de 22,1 bilhões de litros anuais até o ano de 2010, enquanto que no mercado externo, a demanda projetada seja de 5,2 bilhões de litros. Para atender ao incremento na demanda, o setor sucroalcooleiro deverá ex-

pandir a área plantada com cana-de-açúcar dos atuais seis milhões de hectares para 9,1 milhões de ha nos próximos oito anos. Essa expansão deve ocorrer principalmente em áreas tradicionalmente ocupadas pela pecuária extensiva (oeste de São Paulo, Goiás, Triângulo Mineiro, Paraná e Mato Grosso do Sul).

Apesar da importância da cultura de cana-de-açúcar para o Brasil, o rendimento nacional é baixo, com média de 75 ton/ha (www.fnp.com.br), sendo que a principal estratégia para aumento de produtividade é o desenvolvimento de cultivares melhoradas. Em todo o mundo, os programas de melhoramento genético buscam obter cultivares mais produtivas, exibindo tolerância a fatores bióticos e abióticos, de modo a se extrair o potencial máximo da cultura sob condições ambientais específicas. As cultivares comerciais em uso foram originalmente derivadas de hibridações interespecíficas, entre a espécie produtora de açúcar, *S. officinarum* ('cana nobre'), e as espécies selvagens *S. spontaneum*, *S. edule*, *S. barbieri* e *S. sinense*, seguidas de uma série de retrocruzamentos com *S. officinarum*.

Nos programas de melhoramento do Instituto Agronômico de Campinas (IAC) e do Centro de Tecnologia Canavieira (CTC) são realizados preferencialmente cruzamentos biparentais entre cultivares de elite. As sementes dos cruzamentos são germinadas, e as plântulas obtidas são cultivadas em diversas estações experimentais, sendo submetidas à seleção em fase de soca, quantificando-se parâmetros



Figura 1. Vista aérea de experimentos contrastando diversas cultivares de cana-de-açúcar

tecnológicos e biométricos relacionados à produção (Figura 1). Os clones resultantes das diversas fases de seleção são enviados para as usinas cooperadas e avaliados quanto ao seu desempenho sob diversas condições edafoclimáticas. Anualmente, cerca de 2.000 cruzamentos são realizados pelos programas de melhoramento do IAC e CTC, gerando uma população de 3.500.000 *seedlings* para seleção. Nos dois últimos anos, nove novas cultivares foram lançadas pelos dois programas de melhoramento. Portanto, o desenvolvimento de uma cultivar de cana-de-açúcar é um processo que demanda muito tempo (em média 12 anos), trabalho e recursos.

O elevado nível de ploidia ($2n=100-130$), a ocorrência de aneuploidia e a complexidade citogenética dos híbridos interespecíficos, combinado com a dificuldade de se obter total controle na hibridação, tem limitado os estudos genéticos em cana-de-açúcar (Grivet & Arruda, 2001), fazendo do melhoramento genético uma atividade extremamente desafiadora. A maioria das características-alvo da seleção no melhoramento apresenta herança complexa, sendo que em cana-de-açúcar, essa complexidade é intensificada em decorrência da existência da poliploidia e

aneuploidia. Portanto, a cana-de-açúcar é considerada, dentre as plantas cultivadas, como aquela que apresenta a genética mais complexa.

O mapeamento genético apresenta grande potencial para a análise do genoma, pois permite dissecar geneticamente os caracteres de herança complexa em caracteres de herança simples, fornecendo informações importantes para o auxílio do melhoramento (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Tendo em vista que o genoma de cada indivíduo possui características (seqüências de nucleotídeos) que o diferencia dos demais, a análise molecular permite detectar variabilidade genética como também determinar pontos de referência nos cromossomos, possibilitando assim, um aumento da eficiência da seleção precoce e/ou indireta em cana-de-açúcar. O uso de marcadores moleculares possibilita otimizar a prática de seleção no melhoramento, uma vez que são capazes de revelar a variabilidade genética existente no DNA e não estarem sujeitos às influências de efeitos ambientais.

Diversos tipos de marcadores moleculares estão disponíveis para análise do genoma da cana-de-açúcar, sendo que sua utilização no melhoramento poderá permitir a seleção de um clone a partir da informa-

ção de seu genótipo e não de seu fenótipo, num processo denominado de seleção assistida por marcadores. Dessa forma, marcadores moleculares associados a características de interesse, sejam elas qualitativas ou quantitativas, poderão auxiliar o melhorista a selecionar, de forma mais eficiente, os clones com as características desejadas, ainda na fase juvenil (*seedlings*), reduzindo-se o tempo e o espaço necessários para se praticar a seleção, possibilitando ainda, a seleção simultânea para mais de uma característica. O pré-requisito básico para a aplicação da seleção assistida por marcadores no melhoramento da cana-de-açúcar é a construção de mapas genéticos de ligação e a identificação de marcadores fortemente ligados a gene(s) associados à característica de interesse.

Deteção de polimorfismo e nível de ploidia em cana-de-açúcar

Por se tratar de uma planta poliplóide, o mapeamento com marcadores moleculares tal como é feito em plantas diplóides não pode ser diretamente aplicado em cana-de-açúcar, dado à impossibilidade de se identificar o genótipo de um indivíduo a partir do padrão de bandas obtido (da Silva et al., 1995). Em indivíduos poliplóides, há inúmeros alelos de um mesmo loco segregando, os quais podem ser desde nuliplex (i.e. aaaaaaaa, se $x = 8$), a simplex (i.e. Aaaaaaaa), duplex (i.e. AAaaaaaa), triplex (i.e. AAAaaaaa), ou multiplex, com número irregular de cromossomos em muitas classes homólogas em decorrência de aneuploidia em cana-de-açúcar (Hoarau et al., 2001; Grivet & Arruda, 2001). Somado a esses fatores, complicações relacionadas a possíveis duplicações no genoma e confusões entre alelos e locos parálogos (i.e. derivados destas duplicações) são muito difíceis de se esclarecer (Grivet et al., 1996).

Um método para mapeamento genético em poliplóides com pareamento bivalente na meiose,

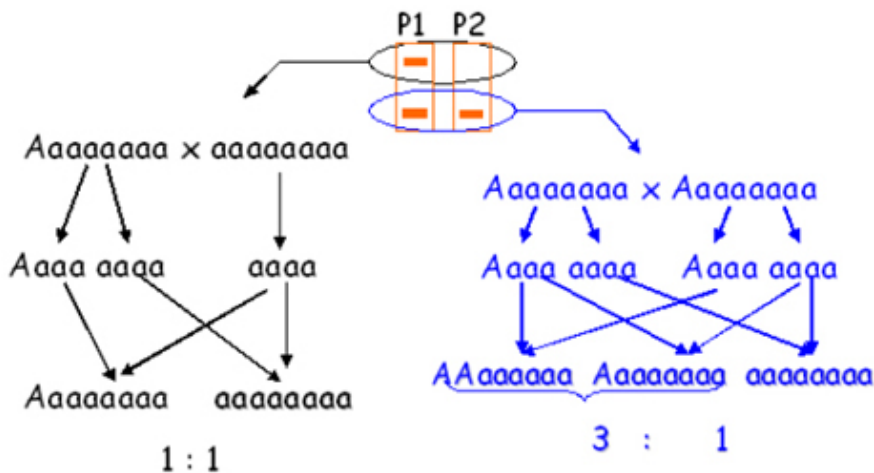


Figura 2. Esquema ilustrando a segregação de marcadores em dose única na descendência do cruzamento

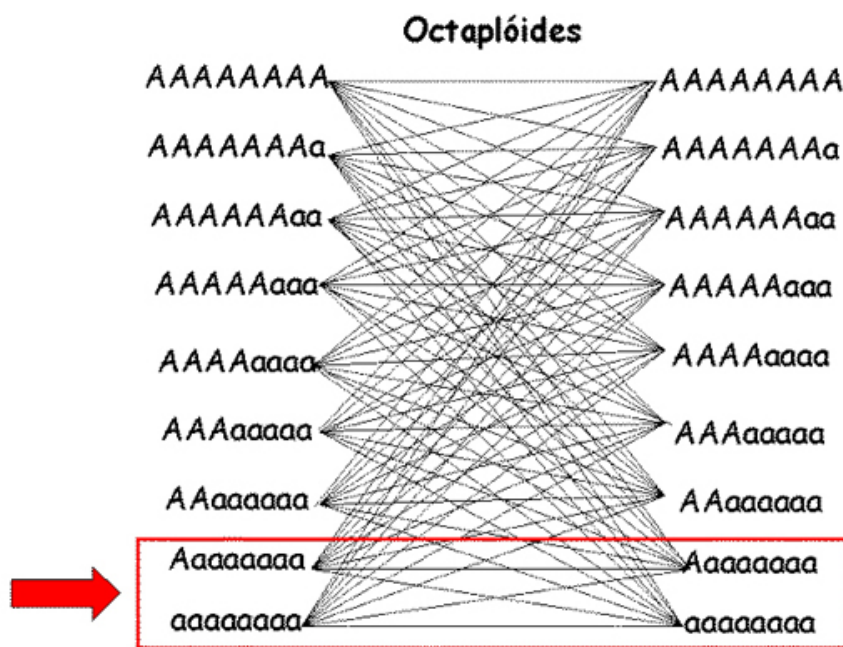


Figura 3. Esquema ilustrando os inúmeros alelos de um mesmo loco segregando. Em destaque os alelos em dose única utilizados para o mapeamento genético

baseado na segregação de marcadores de dose única (MDU) foi proposto por Wu et al. (1992). Esse método é uma alternativa para simplificar o estudo das segregações de múltiplos alelos em diferentes dosagens. No mapeamento de poliplóides empregando-se marcadores em dose única, as bandas são interpretadas como marcadores dominantes, com presença ou ausência do fragmento, desprezando-se o caráter co-dominante dos marcadores RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) e microsatélites (Figura 2 e 3). Os MDUs são detec-

tados pela segregação de fragmentos na proporção de 1:1, onde metade dos gametas contém o DNA de um fragmento e a outra metade não (como por exemplo Aaaaaaaa x aaaaaaaa; Figura 2). Estes tipos de gametas podem ser visualizados na progênie de um determinado cruzamento, onde um fragmento (marcador) está presente em um genitor e ausente no outro (Wu et al., 1992). Outra maneira de detecção de marcadores em dose única é quando um mesmo alelo está presente nos dois genitores em dosagem única (simplex; Aaaaaaaa x Aaaaaaaa),

e a segregação deles na progênie obedece à proporção 3:1 (da Silva et al., 1993; Grivet et al., 1996). Outros tipos de segregação são possíveis de serem observados em poliplóides, no entanto, não existem programas computacionais capazes de analisar estes dados e a análise deve ser conduzida diretamente.

Espécies consideradas alopoliplóides possuem um pareamento cromossômico preferencial na meiose, com formação de bivalentes, devido ao seu genoma ser uma combinação de espécies distintas, reunidas por hibridações interespecíficas. Já as espécies consideradas autopoliplóides, por possuírem um genoma derivado da combinação de mais de dois genomas geneticamente muito similares (homólogos), o pareamento dos cromossomos na meiose ocorrem de forma aleatória ou não preferencial (herança polissômica). Em uma espécie alopoliplóide que possua três conjuntos cromossômicos geneticamente distintos (homeólogos), o pareamento na meiose se daria com preferência de pareamento cromossômico de cada um dos três conjuntos distintos homeólogos. No mapeamento genético desta espécie (trigo, por exemplo), cada grupo de ligação seria a representação dos dois cromossomos homólogos de cada um destes conjuntos. Com isso seria esperado que metade das ligações formadas entre locos estivesse em fase de associação (locos no mesmo cromossomo) e a outra metade em repulsão (um loco em cada cromossomo homólogo), como em um organismo diplóide. Em autopoliplóides, onde os conjuntos de genomas são geneticamente idênticos (homólogos), e o pareamento na meiose se dá de forma aleatória, a probabilidade de haver a segregação de cromossomos homólogos para um mesmo gameta é, dependendo do número de ploidia, muito baixa. As cultivares modernas de cana-de-açúcar apresentam formações bivalentes (preferencial) na meiose, com algumas formações bivalentes ou até multivalentes (Price, 1963).

Os mapas desenvolvidos para

cana-de-açúcar mostraram variações no comportamento dos cromossomos na meiose, dependendo da população ou família estudada. Os níveis de ploidia foram estimados pela determinação da fase de ligação entre os marcadores nos grupos de ligação e pela proporção de marcadores em dose única no genoma (Wu et al., 1992; da Silva et al., 1993). Como um mapa genético é baseado na segregação de locos detectados, esta baixa probabilidade de segregação conjunta de cromossomos faria com que grande porcentagem das ligações formadas entre locos representasse a ligação deles no mesmo cromossomo (associação). Para se detectar ligações entre locos em fase de repulsão em um organismo autopoliplóide seria necessária uma população de mapeamento com cerca de 750 indivíduos (Wu et al., 1992). Em mapas genéticos, onde o mapeamento tem sido geralmente feito com 100 indivíduos, a proporção de fases de ligação em associação ou repulsão seria 1:1 em alopoliplóides, e 1: <0,25 em autopoliplóides (Wu et al., 1992; da Silva et al., 1993).

A detecção de fragmentos em dose única no genoma também é afetada pela variação de comportamento dos cromossomos na meiose (Wu et al., 1992; da Silva et al., 1993). Da Silva et al. (1993) estabeleceram uma relação teórica entre porcentagens de MDU com o tipo de ploidia baseando-se nas frequências esperadas para duas, três e quatro doses, sendo 1/4, 1/8 e 1/16, para alopoliplóides e 3/14, 1/14 e 1/70 em autopoliplóides, respectivamente. Assim, a proporção esperada de fragmentos em múltiplas doses é de 0,44 (44%) para alopoliplóides e de 0,30 (30%) para autopoliplóides. Portanto, em uma população formada por 100 indivíduos, um organismo poliplóide seria considerado com comportamento de alopoliplóide se nos resultados de mapeamento fosse detectada metade das ligações em fase de repulsão e uma proporção praticamente igual de marcadores em dose única e doses múltiplas. Já para ser considerado autopoliplóide

nenhuma fase de repulsão deveria ser detectada nos resultados de mapeamento, sendo confirmado pela constatação de que cerca de 70% dos fragmentos estariam em dose única no genoma.

Mapeamento genético em cana-de-açúcar

Os genótipos cultivados de cana-de-açúcar, bem como as espécies selvagens de *Saccharum*, são presumivelmente altamente heterozigóticos, não havendo linhas puras melhoradas devido a dificuldades de autofecundação e ao pareamento ao acaso de múltiplos cromossomos homólogos. Por estes motivos, as populações segregantes usadas para mapeamento são geralmente progênes de primeira geração, derivadas principalmente do cruzamento entre cultivares e espécies selvagens (Guimarães et al., 1997; Ming et al., 2001). A estratégia de mapeamento de marcadores em dose única (MDU) já permitiu a construção de diversos mapas para cana-de-açúcar, provenientes de populações oriundas de cruzamentos entre espécies selvagens e cultivadas, ou de cruzamentos entre cultivares e/ou clones-elite.

O primeiro mapa desenvolvido para cana-de-açúcar baseou-se em uma progênie de 88 indivíduos F_1 , obtidos do cruzamento de *S. spontaneum* 'SES208' ($2n = 64$) e seu duplo-haplóide 'ADP068', empregando marcadores RAPD ou *Random Amplified Polymorphic DNA* (Al-Janabi et al., 1993). Da Silva et al. (1993) obtiveram outro mapa para o mesmo cruzamento empregando marcadores RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) em dose única. A integração dos dados, com base em 71 plantas em comum, resultou em 64 grupos de ligação e 8 grupos de homologia, i.e. conjunto de cromossomos homólogos, agrupados pela presença de marcadores comuns derivados de uma mesma sonda RFLP ou de loco de microssatélite (da Silva et al., 1995).

Um segundo mapa foi desen-

volvido no *Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement* (CIRAD, França) a partir de 77 indivíduos obtidos pela autofecundação da cultivar 'R570' ($2n = 107 - 115$), e integrou 408 locos RFLPs dispostos em 96 grupos de co-segregação e 10 grupos homologia. (Grivet et al., 1996). Nesta mesma população, Asnaghi et al. (2000) adicionaram 217 marcadores RFLPs, derivados de sondas heterólogas de sorgo, milho e arroz, sendo 66% mapeadas no grupo de ligação VII de sorgo, próximas ao gene de resistência à ferrugem. Outra progênie de autofecundação do mesmo cultivar, com 295 plantas permitiram detectar, a partir de marcadores AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), 887 polimorfismos em dose única que compuseram 120 grupos de co-segregação, totalizando 5.849 cM (1/3 do genoma previsto) (Hoarau et al., 2001). Recentemente, 148 marcadores derivados de "Genes Análogos de Resistência" (RGA) advindos de etiquetas de seqüências expressas (ESTs) seqüenciadas pelo projeto SUCEST e 134 marcadores microssatélites, foram adicionados a este mapa, formando 128 grupos de co-segregação e 8 grupos de homologia (Rossi et al., 2003).

Um terceiro mapa, desenvolvido a partir de 100 indivíduos F_1 do cruzamento entre *S. officinarum* 'Louisiana Purple' ($2n = 80$) e *S. robustum* 'Mol 5829' ($2n = 80$) consistiu de 160 marcadores RAPD e um marcador morfológico dispostos em 51 grupos de ligação (Mudje et al., 1996). A partir deste cruzamento, Guimarães et al. (1999) construíram mapas dos genitores com marcadores RAPD, RFLP e AFLP. O mapa de 'Louisiana Purple' consiste de 341 marcadores em dose única dispostos em 74 grupos de ligação, num total de 1.881 cM, enquanto que o mapa de 'Mol 5829' consiste de 301 marcadores dose única, em 65 grupos de ligação e 1.189 cM (Guimarães et al., 1999).

A partir de uma progênie F_1 com 85 indivíduos, Ming et al. (1998, 2002a), utilizando-se marcadores

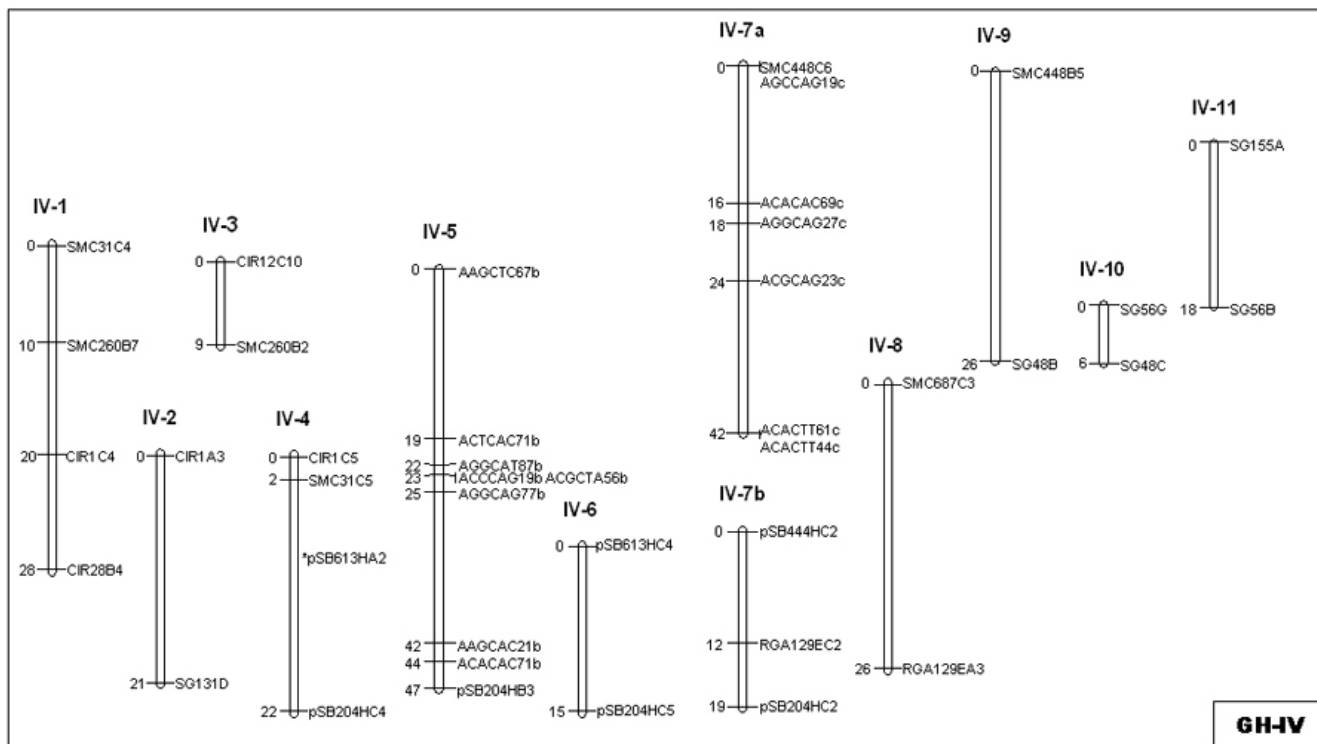


Figura 4. Grupo de Ligação VI (GHIV) do mapa genético gerado por Albino (2006), que ancora no grupo de ligação J de sorgo pela sonda pSB204 (Ming et al., 1998)

RFLP, obtiveram quatro mapas adicionais, sendo um para cada genitor envolvido no cruzamento entre *S. officinarum* 'Green German' (GG, $2n = 97 - 117$) \times *S. spontaneum* 'IND 81-146' (IND, $2n = 52 - 56$) e *S. officinarum* 'Muntok Java' (MJ, $2n = 140$) \times *S. spontaneum* 'PIN 84-1' (PIN, $2n = 96$). Um total de 72 grupos de ligação foram formados para *S. officinarum* GG e MJ e 69 para *S. spontaneum* IND e PIN e o tamanho de cada mapa foi 2.305 cM para GG; 1.443 cM para MJ; 2.063 cM para IND; e 1.303 cM para PIN.

Aitken et al. (2005), a partir de uma progênie F_1 de 277 indivíduos, construíram um mapa para o cruzamento entre o *S. officinarum* (clone 'IJ76-514') e a cultivar australiana 'Q165', constituído por 1.074 marcas, derivadas de marcadores AFLP, *Randomly Amplified DNA Fingerprint* (RAF) e microssatélites, distribuídas em 136 grupos de ligação reunidos em 8 grupos de homologia. A densidade do mapa foi de 9.058,3 cM, com distância entre locos de 9.9 cM. Também na Austrália, dois mapas genéticos foram construídos a partir de uma população de 232 indivíduos do cruzamen-

to entre as cultivares 'Q117' e 'MQ77-340', utilizando marcadores AFLP e microssatélites (Reffay et al., 2005). O mapa de 'MQ77-340' foi formado com 101 grupos de ligação com 342 marcas ligadas e uma cobertura de 3.582 cM. Para 'Q117', um mapa similar foi construído, com 270 marcas ligadas em 93 grupos de ligação e uma cobertura de 3.167 cM.

Mais recentemente, mais dois mapas foram construídos para clones australianos. Uma progênie de 192 indivíduos, obtida do cruzamento entre a cultivar 'Q117' e o clone de elite '74C42', foi mapeada utilizando-se mais de 1000 marcadores SSR, AFLP e RFLP derivados de 'Genes Análogos de Resistência' (RGA). O mapa de 'Q117' contém 407 marcadores em única distribuídos em 75 grupos de ligação, e o mapa de '74C42' contém 445 MDU distribuídos em 84 grupos de ligação. Ambos os mapas formaram 8 grupos de homologia (McIntyre et al., 2005a; 2005b).

No Brasil, um mapa genético de ligação vem sendo construído a partir do cruzamento entre clones de elite de cana-de-açúcar, de um esforço conjunto do laboratório de

Genética e Evolução do Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CEBMEG/UNICAMP), do Centro de Tecnologia Canavieira (CTC), Departamento de Genética da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (ESALQ/USP), e do laboratório de Melhoramento de Plantas do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP). A progênie é composta por 498 indivíduos F_1 , dos quais 100 foram escolhidos aleatoriamente para genotipagem, obtidos a partir do cruzamento dos clones de elite 'SP80-180' e 'SP80-4966', pertencentes ao programa de melhoramento do Centro de Tecnologia Canavieira (CTC). Os resultados obtidos entre os diversos laboratórios envolvidos a partir de marcadores RFLPs, AFLPs e SSRs, foram recentemente integrados por Garcia et al (2006), e resultou em 1.118 marcas em dose única, sendo que 357 marcas foram incorporadas em 131 grupos de co-segregação, totalizando 2.602,4 cM, com distância média entre marcas de 7,3 cM. Recentemente, Albino (2006) utilizando marcadores RFLP derivados de sorgo e de genes análogos de resistência (RGA) identificados em

cana-de-açúcar, acrescentou mais 176 MDU nesta população, totalizando 1.294 marcas (Figura 4). Marcadores microssatélites selecionados a partir de ESTs de cana, identificados pelo projeto SUCEST também estão sendo empregados no mapeamento desta progênie, o que permitirá uma maior saturação deste mapa.

Mapeamento comparativo em cana-de-açúcar

A detecção de alto grau de conservação do conjunto gênico (sintenia), assim como na ordem dos genes nos cromossomos entre espécies de Gramíneas (co-linearidade), sugeriu que características precisamente mapeadas em espécies com genomas grandes e complexos (como cana-de-açúcar), poderiam ser dissecadas pelo isolamento dos mesmos genes em espécies relacionadas com genoma pequeno.

A colinearidade e sintenia observadas em espécies relacionadas levaram a Bennetzen & Freeling (1993) a sugerirem que as Gramíneas fossem tratadas como um sistema genético único, permitindo, num futuro, a elaboração de estratégias globais de melhoramento de gramíneas (Glazmann et al., 1997). O genoma do arroz já foi completamente seqüenciado (Yu et al., 2002; Goff et al., 2002; IRGSP, 2005), possui mapas físicos e genéticos altamente saturados, exibindo alto grau de sintenia com muitos cereais, o que faz desta espécie o organismo ideal para estudos de genética e evolução de plantas. Como espécie-modelo de Gramíneas, o pequeno genoma do sorgo (*Sorghum bicolor* L., 760 Mpb) é o complemento lógico mais próximo do genoma totalmente seqüenciado de arroz (*Oryza sativa*, 440 Mpb), e encontra-se sendo totalmente seqüenciado (Kresovich et al., 2005).

Com respeito à tribo *Andropogoneae*, os primeiros estudos comparativos eram focados entre sorgo e milho (Hulbert et al., 1990; Binelli et al., 1992; Whitkus et al., 1992; Melake-Berhan et al., 1993;

Pereira et al., 1994), demonstrando que as duas espécies dividiam inúmeros locos ortólogos (i.e. homólogos por descendência) agrupados em regiões colineares. D'Hont et al. (1994) comparando os genomas de milho e cana-de-açúcar, foram os primeiros a demonstrar que o genoma da cana-de-açúcar poderia ser beneficiado pela análise comparativa de espécies relacionadas. Glazmann et al. (1997) realizaram análise comparativa entre diversas gramíneas e verificaram estreita relação entre milho, arroz e o grupo de ligação B de sorgo.

Dufour et al. (1997) realizaram análise comparativa entre os genomas de sorgo e cana-de-açúcar utilizando 84 sondas heterólogas previamente empregadas no mapeamento de cana-de-açúcar e milho. A forte co-linearidade e sintenia observadas entre sorgo e cana-de-açúcar levaram a sugerir o genoma diplóide de sorgo como o elo central no mapeamento comparativo de espécies pertencentes à tribo *Andropogoneae* (milho, sorgo e cana-de-açúcar). A maioria dos grupos de sintenia sorgo/cana-de-açúcar mostrou homologia a duas regiões distintas duplicadas no genoma de milho, sendo consistente com a origem tetraplóide deste último. Milho, sorgo e cana-de-açúcar exibem alto grau de co-linearidade genômica, porém, os genomas de sorgo e cana-de-açúcar exibem organização cromossômica mais similar (Dufour et al., 1997; Ming et al., 1998).

Guimarães et al. (1997) realizaram análise comparativa entre *Saccharum*, sorgo e milho e também verificaram uma relação quase perfeita entre *Saccharum* e sorgo. Apenas duas inversões na ordem dos marcadores foram observadas entre *S. robustum* e sorgo enquanto que entre *S. officinarum* e sorgo a colinearidade foi perfeita. Asnaghi et al. (2000) empregaram sondas heterólogas de arroz, milho e sorgo para saturar a região próxima à marca *CDSR0029*, relacionada à resistência a ferrugem, no mapa de 'R570' de cana-de-açúcar. Estas compara-

ções permitiram a identificação de segmentos de cromossomos homeólogos entre a extremidade do grupo de ligação D de sorgo, grupo de ligação 2 de arroz e aos grupos de ligação 4 e 5 de milho. Ming et al. (1998) compilaram dados de seis mapas de *Saccharum* (GG, IND, MJ, PIN, *S. officinarum* 'Louisiana Purple', *S. robustum* 'MOL') e alinharam o mapa obtido com o mapa de sorgo. Aproximadamente 84% dos locos mapeados por 242 sondas comuns foram homólogos entre *Saccharum* e sorgo, e apenas dois arranjos intercromossômicos e dois intracromossômicos diferem os genomas de *S. officinarum* e *S. spontaneum* de sorgo. Pelo menos cinco grupos homólogos em *Saccharum* assemelham quase que totalmente a um único cromossomo de sorgo (Figura 4). Posteriormente, Ming et al. (2002a) obtiveram um mapa consenso para GG, IND, MJ e PIN composto de 289 grupos de ligação em 13 grupos de homologia, e o alinharam com o genoma de sorgo. Dos 982 locos mapeados no mapa consenso, 845 (86%) apresentaram homologia ao mapa de sorgo, indicando uma estrutura genômica altamente conservada entre os dois gêneros.

Jordan et al. (2004) empregando marcadores RFLP, encontraram sete marcas associadas ao perfilhamento e outras seis associadas à capacidade de rebrota em cana-de-açúcar. Estas marcas derivaram de oito sondas RFLP previamente mapeadas em cana-de-açúcar e/ou sorgo, as quais estão localizadas em ou próximas a QTLs relacionados à brotação e capacidade de formação de rizomas em sorgo. Estas observações reforçam o uso do sorgo como referência para simplificar o mapeamento de cana-de-açúcar. Recentemente, McIntyre et al. (2005a) isolaram 54 "Genes Análogos de Resistência" (RGA) na biblioteca de EST do clone australiano 'Q117' de cana-de-açúcar. Estas marcas foram utilizadas para mapear uma progênie composta por 192 indivíduos derivados do cruzamento entre 'Q117' e '74C42', denominada po-

pulação Q1, e 120 indivíduos derivados do cruzamento entre o cultivar de sorgo '31945-2' e a espécie selvagem *Sorghum arundinaceus*, denominada população S3. Vinte e três marcadores RGA foram comuns entre as duas espécies, o que revelou a existência de uma sintenia de *clusters* de RGA. Rossi et al. (2003) já havia relatado a organização de RGAs em *clusters* em cana-de-açúcar.

O mapeamento comparativo por meio de mapas de RFLPs possibilita um melhor conhecimento da organização do genoma e do processo evolutivo entre espécies relacionadas, assim como permitem o desenvolvimento de estudos genéticos sobre caracteres agrônomicos, por meio da localização de genes maiores e QTLs (locos de características quantitativas). Os estudos comparativos têm revelado uma grande co-linearidade entre genomas, demonstrando que um número surpreendentemente reduzido de rearranjos cromossômicos distingue espécies e gêneros correlacionados (Bennetzen & Ma, 2003). Tal conhecimento sugere que diversos genes de interesse agrônomico são compartilhados por diversos genomas, o que possibilita a troca de informações relevantes sobre suas funções e localizações, aumentando a eficiência e o aproveitamento dos recursos investidos em análises genômicas.

Mapeamento de locos de caracteres quantitativos - QTLs

Uma importante aplicação dos mapas genéticos é o estudo de locos que contribuem para a variação de características de interesse agrônomico. A maioria das características de importância econômica resulta da ação conjunta de vários genes, sendo denominadas poligênicas, quantitativas ou de herança complexa, sendo muito afetadas pelo ambiente. Para a grande parte destas características, poucas informações existem sobre número, posição cromossômica, magnitude do efeito e interações dos locos que controlam sua expressão. Estes locos são denominados QTL (*Quantitative Trait*

loci), ou seja, locos controladores de característica quantitativa (Ferreira & Grattapaglia, 1998). QTL também pode ser definido como um segmento de cromossomo que afeta um determinado caráter, não sendo necessariamente um único gene (Falconer & Mackay, 1996). O mapeamento de QTL é baseado em testes de associação entre marcadores moleculares e dados fenotípicos, por meio de várias metodologias estatísticas, que permitem estimar o número e a localização dos genes que controlam a variação fenotípica de um caráter, bem como a magnitude dos seus efeitos e as interações com outros QTLs.

Em cana-de-açúcar, Sills et al. (1995) realizaram uma primeira tentativa de analisar QTLs utilizando 83 MDU derivados de RAPD em uma progênie de apenas 44 indivíduos, e identificaram associações significativas ($P < 0,05$) por análise de variância simples entre marcas individuais e as características número de perfilhos; conteúdo de sacarose e fibra; peso fresco; diâmetro médio de colmo; e perfilhos com flor ou com ferrugem. Dois outros estudos preliminares relataram a associação de marcadores moleculares com resistência a doenças e florescimento. Daugrois et al. (1996) identificaram, no mapa do cultivar 'R570' de cana-de-açúcar, um possível gene principal para resistência a ferrugem (agente causal: *Puccinia melanocephala*) localizados a cerca de 10 cM do marcador RFLP *CDSR0029*. Foi o primeiro relato de herança monogênica para resistência a doença em cana-de-açúcar. A sintenia de cana-de-açúcar com sorgo, milho e arroz foi usada para posicionar este gene (Asnaghi et al., 2000). Guimarães et al. (1997) encontrou um marcador RFLP (*umc114e.2490*) associado com florescimento induzido por dias curtos. No entanto, as populações de mapeamento usadas nos dois estudos foram muito pequenas para uma análise completa de QTLs.

Guimarães (1999) identificou por análise de regressão e mapeamento por intervalos regiões genômicas associadas à QTLs refe-

rentes a número, diâmetro e peso de colmos; porcentagem de colmos com inflorescência; porcentagem de colmos infectados com carvão (agente causal: *Ustilago scitaminea*); porcentagem de fibra e teor de sacarose, em uma progênie do cruzamento entre *S. officinarum* x *S. robustum*. Foram detectadas associações significativas ($P < 0,05$) para todos os caracteres avaliados, sendo identificados QTLs com contribuições complementares provenientes de ambos os genitores para vários deles. O grupo de co-segregação 7 de *S. officinarum* foi particularmente interessante, uma vez que ancorou QTLs para três dos sete caracteres fenotípicos avaliados, dentre eles o florescimento, sendo que o loco *umc114e.2490* mapeado nesta região genômica já tinha sido associado com florescimento em milho, sorgo e arroz por vários outros autores. Assim, além da grande co-linearidade dos marcadores, pode haver também a conservação de QTLs controlando fenótipos de interesse agrônomico entre *Sorghum* e *Saccharum*.

Duas populações segregantes derivadas de cruzamentos entre *S. officinarum* e *S. spontaneum*, compostas por mais de 200 indivíduos, foram mapeadas com 1.255 marcadores em dose única; avaliadas para detecção de QTLs associados com caracteres como produção de açúcar e de seus componentes de produção (peso e número de colmo e brix); altura de planta; e florescimento, e comparadas aos mapas genéticos de milho e sorgo (Ming et al., 2001; 2002b; 2002c). Foram encontradas associações significativas para todos os caracteres avaliados. Quatro QTLs controlando altura de planta e um QTL controlando florescimento em cana-de-açúcar, correspondem a quatro (de seis) e a um (de três) QTLs em sorgo, respectivamente. Utilizando uma progênie de 295 indivíduos derivados da cultivar 'R570', Hoarau et al. (2002) encontraram 40 QTAs (*Quantitative Trait Alleles*) presumíveis ($P < 0,05$) relacionados a quatro componentes de produção

para cana-de-açúcar (altura de planta, número e diâmetro de colmos e brix).

Os clones de elite australianos 'Q117' e '74C42', híbridos de *Saccharum* spp. foram avaliados para localização de QTLs associados a perfilhamento, capacidade de rebrota e resistência a doenças. Utilizando análises de marcas simples, Jordan et al. (2004) encontraram 16 marcadores associados a perfilhamento e outros 14 associados a rebrota, todos com associações altamente significativas ($P < 0,01$). Estas marcas derivam de oito sondas RFLP previamente mapeadas em cana-de-açúcar e/ou sorgo, as quais estão localizadas em ou próximas a QTLs relacionados à brotação e capacidade de formação de rizomas em sorgo. McIntyre et al. (2005b) mapearam três sondas RGA significativamente associadas à resistência à ferrugem, que correspondem a um QTL associado ao mesmo caráter localizado no grupo de ligação E (LG E) de sorgo. Outro acesso, 'MQ77-340', descendente de 'Mandalay', um importante clone de *S. spontaneum* usado em programas de melhoramento na Austrália, foi avaliado para caracteres relacionados a açúcar (POL, brix, CCS – açúcar comercial); percentual de fibra; peso de colmo; toneladas de cana por hectare (TCH); e toneladas de açúcar por hectare (TSH), sendo mapeados vários marcadores, com efeitos positivos e negativos, para todos os caracteres analisados (Reffay et al., 2005).

Na população de 'SP80-180' x 'SP80-4966', foram detectados, através de análises de marcas individuais (ANAVA e regressão linear) e intervalo composto, associações significativas ($P < 0,005$) de marcadores AFLP com altura e diâmetro de colmo; número de perfilhos; brix (% no caldo); percentual de fibra; % POL na cana (PCC); e tonelagem de cana por hectare (TCH) (Kido, 2003). A mesma população foi avaliada por da Silva & Bressiani (2005), utilizando marcadores RFLP derivados de EST associados ao metabolismo de sacarose. Por meio de análise de variância, um marcador em dose única

(pA35) foi associado significativamente ($P < 0,01$) ao conteúdo de açúcar.

No entanto, os QTLs identificados até o momento, têm se mostrado suficientes para explicar uma baixa porcentagem da variação observada para as características quantitativas, possivelmente refletindo seu controle poligênico complexo e a redundância genética existente em cana-de-açúcar, onde qualquer loco gênico e seu complemento alélico podem estar representado várias vezes em cromossomos homólogos de cada um dos dois genomas presentes nas variedades modernas de cana-de-açúcar (Casu et al., 2005).

A construção de mapas genéticos saturados, baseados em progênies de materiais elite, representativos de programas de melhoramento, que segregam para características de importância agroindustriais, poderá viabilizar a seleção assistida por marcadores, permitindo o planejamento de cruzamentos e a aplicação de seleção indireta ou precoce. Apesar dos avanços que se têm sido obtidos com o auxílio dos marcadores moleculares em cana-de-açúcar, é necessário que as informações geradas possam ser traduzidas num procedimento prático e de rotina ao melhorista, de modo a acelerar o desenvolvimento de novas variedades. Os marcadores e QTLs fortemente ligados aos componentes de produção e outros caracteres de interesse agrônomicos identificados por mapeamento em cana-de-açúcar, necessitam ser disponibilizados de uma forma mais simples e rápida para os programas de seleção, permitindo que efetivamente, a promessa de seleção assistida por marcadores seja implantada em cana-de-açúcar. Diversas tecnologias de genotipagem de alta eficiência estão à disposição, mas seu custo para uso em larga escala ainda é um fator limitante. Portanto, o uso de seleção assistida por marcadores no melhoramento da cana-de-açúcar, requer o desenvolvimento de estratégias que superem os gargalos impostos pelas metodologias atuais. Explorar a formação derivada da sequência do

genoma ou transcriptoma (banco de ESTs), e/ou mapas genéticos comparativos de outras gramíneas modelo, poderá ser uma estratégia bastante interessante, visto que a vasta informação existente poderá ser compartilhada com cana-de-açúcar, permitindo a localização de genes de importância econômica. A complementaridade de metodologias convencionais e moleculares deverá resultar num futuro próximo, num procedimento mais eficiente e rápido no melhoramento da cana-de-açúcar.

Agradecimentos

Os autores expressam seus agradecimentos a FAPESP, CNPq e PADCT-MCT pelo auxílio financeiro, e ao Centro de Tecnologia de Canavieira.

Referências

- Aitken KS, Jackson PA, McIntyre CL. 2005. A combination of AFLP and SSR markers provides extensive map coverage and identification of homo(eo)logous linkage groups in sugarcane cultivar. *Theoretical and Applied Genetics* 110: 789-801.
- Albino JC. 2006. Mapeamento genético em cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) utilizando sondas heterólogas de sorgo e Genes Análogos de Resistência. 2006. 121p. Dissertação (Mestrado) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba/SP.
- Al-Janabi SM, Honeycutt RJ, McClelland M, Sobral BWS. 1993. A genetic linkage map of *Saccharum spontaneum* L. 'SES208'. *Genetics* 134: 1249-1260.
- Asnaghi C, Paulet F, Kaye C, Grivet L, Deu M, Glaszmann JC, D'Hont A. 2000. Application of synteny across Poaceae to determine the map location of sugarcane rust resistance gene. 2000.

- Theoretical and Applied Genetics 101: 962-969.
- Bennetzen JL, Freeling M. 1993. Grasses as a single genetic system: genome composition, colinearity and compatibility. *Trends in Genetics* 9: 259-261.
- Bennetzen J, Ma J. 2003. The genetic colinearity of rice and other cereals on the basis of genomic sequence analysis. *Current Opinion in Plant Biology* 6: 128-133.
- Binelli G, Gianfranceschi L, Pe ME, Taramino G, Bussi C, Stenhouse J, Ottaviano E. 1992. Similarity of maize and sorghum genomes as revealed by maize RFLP probes. *Theoretical and Applied Genetics* 84: 10-16.
- Casu RE, Manners JM, Bonnet GD, Jackson PA, McIntyre CL, Dunne R, Chapman SC, Rae AL, Grof CPL. 2005. Genomics approaches for de identification of genes determining important traits in sugarcane. *Field Crop Research* 92: 137-147.
- Da Silva J, Sorrells ME, Burnquist WL, Tanksley SD. 1993. RFLP linkage map and genome analysis of *Saccharum spontaneum*. *Genome* 36: 782-791.
- Da Silva, JAG, Honeycutt RJ, Burnquist WL, Al-Janabi SM, Sorrells ME, Tanksley SD, Sobral BWS. 1995. *Saccharum spontaneum* L. 'SES208' genetic linkage map containing RFLP and PCR-based markers. *Molecular Breeding* 1: 165-179.
- Da Silva, JA, Bressiani JA. 2005. Sucrose synthase molecular marker associated with sugar content in elite sugarcane progeny. *Genetics and Molecular Biology* 28: 294-298.
- Daugrois JH, Grivet L, Roques D, Hoarau JY, Lombard H, Glazmann JC, D'Hont A. 1996. A putative major gene for rust resistance linked with a RFLP marker in sugarcane cultivar 'R570'. *Theoretical and Applied Genetics* 92: 1059-1064.
- D'Hont A, Lu YH, Gonzáles De Leon D, Grivet L, Feldmann P, Lanaud C, Glazmann JC. 1994. A molecular approach to unravelling the genetics of sugarcane, a complex polyploid of the andropogoneae. *Genome* 37: 222-230.
- Dufour P, Deu M, Grivet L, D'Hont A, Paulet F, Bouet A, Anaud C, Glazmann JC, Hamon P. 1997. Construction of a composite sorghum genome map and comparison with sugarcane, a related complex polyploid. *Theoretical and Applied Genetics* 94: 409-418.
- Falconer DS, Mackay TFC. 1996. *Introduction to quantitative genetics*. 4.ed. New York: Longman Group Ltda, 464 p.
- Ferreira ME, Grattapaglia D. 1998. *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*. 3. ed. Brasília: EMBRAPA, CENARGEN, 220 p.
- Garcia AAF, Kido EA, Meza NA, Souza HMB, Pinto LR, Pastina MM, Leite CS, da Silva JAG, Ulian EC, Figueira A, Souza AP. 2006. Development of an integrated genetic map of a sugarcane (*Saccharum* spp.) commercial cross based on a maximum-likelihood approach. *Theoretical and Applied Genetics* 112: 298-314.
- Glazmann JC, Dufour P, Grivet L, D'Hont A, Deu M, Paulet F, Hamon P. 1997. Comparative genome analysis between several tropical grasses. *Euphytica* 96: 13-21.
- Goff SA, Ricke D, Lan TH, Presting G, Wang R, Dunn M, Glazebrook J, Sessions A, Oeller P, Varma H. 2002. A draft sequence of rice genome (*Oryza sativa* L. Ssp. Japonica). 2002. *Science* 296: 92-100.
- Grivet L, D'Hont A, Roques D, Feldmann P, Lanaud C, Glazmann JC. 1996. RFLP mapping in cultivated sugarcane (*Saccharum* spp.): genome organization in a highly polyploid and aneuploid interspecific hybrid. *Genetics* 142: 987-1000.
- Grivet L, Arruda P. 2001. Sugarcane genomics: depicting the complex genome of an important tropical crop. *Current Opinion in Plant Biology* 5: 122-127.
- Guimarães CT, Sills GR, Sobral BW. 1997. Comparative mapping of Andropogoneae: *Saccharum* L. (sugarcane) and its relation to sorghum and maize. *Proc. of the National Academy of Science USA* 94: 14261-14266.
- Guimarães CT. 1999. *Mapeamento comparativo e detecção de QTLs em cana-de-açúcar utilizando marcadores moleculares*. 70 f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa/MG.
- Guimarães CT, Honeycutt RJ, Sills GR, Sobral BWS. 1999. Genetic maps of *Saccharum officinarum* L. and *Saccharum robustum* Brandes & Jew. *Ex. Grassl. Genetics and Molecular Biology* 22: 125-132.
- Hoarau JY, Offman B, D'Hont A, Risterucci AM, Roques D, Glazmann JC, Grivet L. 2001. Genetic dissection of a modern sugarcane cultivar (*Saccharum* spp.). I. Genome mapping with AFLP markers. *Theoretical and Applied Genetics* 103: 84-97.
- Hoarau JY, Grivet L, Offmann B. 2002. Genetic dissection of a modern sugarcane cultivar (*Saccharum* spp.). II. Detection of QTLs for yield components. *Theoretical and Applied Genetics*

105: 1027-1037.

- Hulbert SH, Richter TE, Axtell JD, Bennetzen JL. 1990. Genetic mapping and characterization of sorghum and related crops by means of maize DNA probes. Proc. of the National Academy of Science USA 87: 4251-4255.
- International Rice Genome Sequencing Project. 2005. The map-based sequence of the rice genome. Nature 436: 793-800.
- Jordan DR, Casu RE, Besse P, Carrol BC, Berding N, McIntyre CL. 2004. Markers associated with stalk number and suckering in sugarcane colocalize with tillering and rhizomatousness QTL in sorghum. Genome 47: 988-993.
- 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. 164p. Tese (Doutorado) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba/SP.
- Kresovich S, Barbazuk B, Bedel A, Borrel A, Buell CR, Burke J. et al. 2005. Toward sequencing the sorghum genome. A U.S. National Science Foundation-Sponsored Workshop Report. Plant Physiology 138: 1898-1902.
- McIntyre CL, Whan VA, Croft B, Magarey R, Smith GR. 2005a. Identification and validation of molecular markers associated with Pachymetra root rot and brown rust resistance in sugarcane using map- and association-based approaches. Molecular Breeding 16: 151-161.
- McIntyre CL, Casu RE, Drenth J, Knight D, Whan VA, Croft BJ, Manners JM. 2005b. Resistance gene analogues in sugarcane and their association with quantitative trait loci for rust resistance. Genome 48: 391-400.
- Melake-Berhan A, Hulbert SH, Butler LG, Bennetzen JL. 1993. Structure and evolution of genomes of *Sorghum bicolor* and *Zea mays*. Theoretical and Applied Genetics 86: 598-604.
- Ming R, Liu SC, Lin YR, da Silva J, Wilson W, Braga D, Van Deynze A, Wenslaff TF, Wu KK, Moore PH, Burnquist W, Sorrels ME, Irvine JE, 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, Paterson AH. 2001. QTL analysis in a complex autopolyploid: genetic control of sugar content in sugarcane. Genome Research 11: 2075-2084.
- Ming R, Liu SC, Bowers JE, Irvine JE, Paterson AH. 2002a. Construction of a *Saccharum* consensus genetic map from two interspecific crosses. Crop Science 42: 570-583.
- Ming R, Del Monte TA, Hernandez E, Moore PH, Irvine JE, Paterson AH. 2002b. Comparative analysis of QTLs affecting plant height and flowering among closely-related diploid and polyploid genomes. Genome 45: 794-803.
- Ming R, Wang YW, Draye X, Moore PH, Irvine JE, Paterson AH. 2002c. Molecular dissection of complex traits in autopolyploids: mapping QTLs affecting sugar yield and related traits in sugarcane. Theoretical and Applied Genetics 105: 332-345.
- Mudje J, Anderson WR, Kehre RL, Fairbanks, DJ. 1996. A RAPD genetic map of *Saccharum officinarum*. Crop Science 36: 1362-1366.
- Pereira MG, Lee M, Bramel-Cox P, Woodman W, Doebley J, Whitkus R. 1994. Construction of an RFLP map in sorghum and comparative mapping in maize. Genome 37: 236-243.
- Price S. 1963. Cytogenetics of modern sugarcane. Economic Botany 17: 97-105.
- Reffay N, Jackson PA, Aitken KS, Hoarau JY, D'Hont A, Besse P, McIntyre CL. 2005. Characterization of genome regions incorporated from an important wild relative into Australian sugarcane. Molecular Breeding 15: 367-381.
- Rossi M, Araujo PG, Paulet F, Garsmeur O, Dias VM, Chein H, Van Sluys MA, D'Hont A. 2003. Genomic distribution and characterization of EST-derived resistance gene analogs (RGAs) in sugarcane. Molecular and General Genetics 269: 406-19.
- Sills GR, Bridges W, Al-Janabi SM, Sobral BWS. 1995. Genetic analysis of agronomic traits in crosses between sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) and presumed progenitor (*S. robustum* Brandes, Jew. Ex Grassl). Molecular Breeding 1: 355-363.
- Whitkus R, Doebley J, Lee M. 1992. Comparative genome mapping of sorghum and maize. Genetics 132: 1119-1130.
- Wu KK, Burnquist W, Sorrels ME, Tew TL, Moore PH, Tanksley SD. 1992. The detection and estimation of linkage in polyploids using single does restriction fragments. Theoretical and Applied Genetics 83: 294-300.
- Yu J, Hu S, Wang J, Wong GKS, Li S, Liu B, Deng Y, Dai L. 2002. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *indica*). Science 296: 76-91.