



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
PRODUÇÃO VEGETAL E BIOPROCESSOS ASSOCIADOS

MAPEAMENTO DE QTL PARA RESISTÊNCIA A *Sporisorium scitamineum* EM
POPULAÇÃO BI-PARENTAL DE CANA-DE-AÇÚCAR

BIANCA ROCHA SILVEIRA

Araras

2016



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
PRODUÇÃO VEGETAL E BIOPROCESSOS ASSOCIADOS

MAPEAMENTO DE QTL PARA RESISTÊNCIA A *Sporisorium scitamineum* EM
POPULAÇÃO BI-PARENTAL DE CANA-DE-AÇÚCAR

BIANCA ROCHA SILVEIRA

ORIENTADOR: PROF.^a DR.^a MONALISA SAMPAIO CARNEIRO

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Produção
Vegetal e Bioprocessos Associados
como requisito parcial à obtenção do
título de MESTRE EM PRODUÇÃO
VEGETAL E BIOPROCESSOS
ASSOCIADOS

Araras

2016

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária UFSCar
Processamento Técnico
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S587m Silveira, Bianca Rocha
Mapeamento de QTL para resistência a *Sporisorium scitamineum* em população bi-parental de cana-de-açúcar / Bianca Rocha Silveira. -- São Carlos : UFSCar, 2016.
58 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2016.

1. Cana-de-açúcar. 2. Setor sucroenergético. 3. Doença do carvão. 4. *Sporisorium scitamineum*. 5. Marcadores moleculares microssatélites. I. Título.

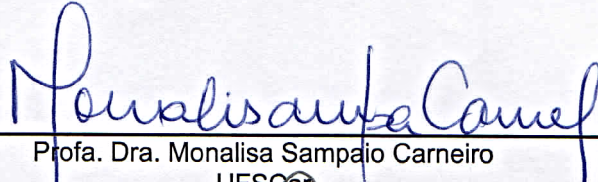


UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Agrárias
Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados

Folha de Aprovação


Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Bianca Rocha Silveira, realizada em 24/11/2016:



Profa. Dra. Monalisa Sampaio Carneiro
UFSCar



Profa. Dra. Mariângela Cristofani-Yaly
IAC



Prof. Dr. Luís Otávio Saggion Beriam
IBC-SP

AGRADECIMENTOS

À Deus.

Aos meus pais que me enchem de amor, oportunidades, valores e muita sabedoria, além do apoio, palavras de incentivo, confiança e esperança depositada em mim. Em especial à minha mãe pela compreensão, amizade, força e confiança e ao meu pai, anjinho que olha por mim, se alegra e com certeza se orgulha por esta conquista a qual ele sempre sonhou e se orgulhou, mesmo que no início.

À Prof^a. Dr^a. Monalisa Sampaio Carneiro, incentivadora, guia e mestre aplicada na minha formação profissional e pessoal, pela oportunidade de me orientar.

A Universidade Federal de São Carlos pelo apoio técnico e científico para o desenvolvimento de minha carreira acadêmica e ajuda a realização deste trabalho.

Ao Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de São Carlos e aos professores do Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados pelos conhecimentos compartilhados, em especial ao Prof. Dr. Rodrigo Gazaffi pelo auxílio no trabalho.

Aos funcionários de todos os Setores e Unidades da UFSCar, pelo auxílio prestado, por propiciar um ambiente limpo e agradável.

A toda equipe do PMGCA – UFSCar pela ajuda e companheirismo durante a execução do projeto e no dia a dia.

A CAPES pela concessão de bolsa de estudo durante um período do mestrado.

A todos os amigos e familiares, avô e avó, que sempre me acompanharam e apoiaram nesta difícil jornada, mesmo de longe. Em especial ao Felipe ao fim da jornada, obrigada pela compreensão e incentivo.

Aos amigos do laboratório de Biotecnologia de Plantas, pela troca de conhecimentos, experiência e ajuda nos momentos de dúvidas. Além de momentos de descontração e carinho durante esses anos de convivência, se tornaram para mim grandes irmãos.

Aos amigos que a vida me deu nesta cidade e a tudo vivido por aqui.

SUMÁRIO

	Página
ÍNDICE DE TABELAS.....	i
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ii
LISTA DE SIGLAS.....	vi
RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	viii
1 INTRODUÇÃO.....	01
2 OBJETIVOS.....	02
2.1 Geral.....	02
2.2 Específicos.....	03
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	03
3.1 Cultura e melhoramento da cana-de-açúcar.....	03
3.2 O carvão em cana-de-açúcar.....	06
3.3 Mapa genético e Mapeamento de QTL em cana-de-açúcar.....	13
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	16
4.1 Caracterização da população de mapeamento.....	16
4.2 Análises moleculares.....	16
4.2.1 Extração e quantificação de DNA.....	16
4.2.2 Genotipagem dos marcadores moleculares microssatélites.....	17
4.3 Avaliação da resistência ao carvão na população de mapeamento.....	19
4.3.1 Fonte do inóculo e inoculação do fungo <i>S. scitamineum</i>.....	19
4.3.2 Avaliação da resistência.....	22
4.4 Construção de mapa e mapeamento de QTL.....	23
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	23
5.1 Genotipagem da população, análise da segregação dos locos e construção do mapa de ligação.....	23
5.2 Análise fenotípica.....	29
5.3 Mapeamento de QTL.....	44
6 CONCLUSÕES.....	47
7 LITERATURA CITADA.....	48

ÍNDICE DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Segregação das marcas obtidas para a população do cruzamento entre as variedades de cana-de-açúcar SP81-3250 e RB925345.....	24
Tabela 2. Estimativa da variância genética, variância ambiental, influência da repetição, padrões e germinação e do coeficiente de herdabilidade no sentido amplo individual e em média na progênie F_1 observada ao longo de 25 avaliações para incidência do carvão no experimento I.....	39
Tabela 3. Estimativa da variância genética, variância ambiental, influência da repetição, padrões e germinação e do coeficiente de herdabilidade no sentido amplo individual e em média na progênie f_1 observada ao longo de 25 avaliações para incidência do carvão no experimento II.....	43

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Composição genética de variedades modernas, demonstrando que a maior porção dos genes é de <i>S. officinarum</i> , seguido por <i>S. spontaneum</i> em pequena quantidade e ainda, genes recombinantes entre estas duas variedades.....	5
Figura 2. Ciclo do carvão em cana-de-açúcar. 1) planta de cana-de-açúcar em campo, 2) surgimento do chicote, sintoma e sinal do carvão, 3) teliósporos liberados da planta, 4) germinação dos teliósporos, ocorrência da meiose e formação de probasídios haploides, 5) formação de micélio primário a partir dos basidiósporos e fusão de micélios primários compatíveis, 6) micélios secundários, irá infectar a planta sadia.....	7
Figura 3. Plantas infectadas pelo <i>S. Scitamineum</i> com sintomas da doença. A) chicote, b) superbrotamento, c) planta sadia, d) planta doente com sintomas.....	8
Figura 4. Extração de DNA. a) parte do colmo de cana-de-açúcar retirado do campo, b) palmito da cana-de-açúcar para extração, c) cadinhos e bisturis: utilizadas para o processo de maceração mecânica, d) processo de maceração palmito para posteriores etapas de extração do DNA.....	17
Figura 5. Obtenção de esporos do <i>S. scitamineum</i> . a) plantas de cana-de-açúcar no campo apresentando o sintoma da doença, indicado por setas, na Estação Experimental de Valparaíso - SP, b) separação dos chicotes nas plantas com doença, c) chicotes, com teliósporos da doença.....	19
Figura 6. Processo de inoculação do fungo <i>S. scitamineum</i> iniciado em a) recipiente contendo 10g de teliósporos armazenados em sílica, b) teliósporos colocados em béquer, c) mistura de teliósporos com água destilada, d) suspensão viscosa, e) suspensão de inoculação pronta e dividida em béqueres, f) inoculação na base da gema das plantas por injeção de	

teliósporos, g) plantação de toletes inoculados em bandejas, h) bandejas com substrato e mínimo de 50 toletes inoculados de cada genótipo plantados..... 21

Figura 7. Mapa de ligação integrado de cana-de-açúcar com base na progênie do cruzamento de SP81-3250 e RB925345. À direita estão os nomes dos marcadores com as siglas D1, para marca de origem do genitor SP81-3250, D2 para marca de origem do genitor RB925345 ou C para marca de origem em ambos os genitores. À esquerda, os números correspondem às distâncias em que as marcas se encontram no mapa, em cM..... 26

Figura 8. Incidência de *S. Scitamineum* em genótipos da progênie F₁ obtida com o cruzamento entre SP81-3250 e RB925345 em casa de vegetação (experimento I: 253 dias e experimento II: 198 dias). As cores indicam as repetições: em vermelho está representada a primeira repetição do experimento I, laranja, segunda repetição para experimento I; roxo primeira repetição no experimento II e verde, segunda repetição no experimento II..... 30

Figura 9. Incidência de *S. scitamineum* nos genitores, SP81-3250 e RB925345, e 6 variedades padrões em casa de vegetação, ao longo de 253 dias para o experimento I e 198 dias para o experimento II. Em vermelho está representado o experimento I com 6 repetições de padrões, e em azul o experimento II com 7 repetições de padrões, conforme o número de preparo de suspensão para inóculo em cada experimento..... 31

Figura 10. Registro da temperatura média semanal a partir do período de inoculação dos toletes de cana-de-açúcar com o fungo *S. scitamineum* até as avaliações de incidência da doença. O período das avaliações da doença começam em 0 e vão até 25..... 34

Figura 11. Distribuição dos valores de AACPD (BLUPs) na progênie F₁ oriunda do cruzamento entre os genitores SP81-3250 e RB925345, representada a frequência de genótipos com os valores da área calculada.

- Indicação da curva de tendência dos valores de AACPD (BLUPs) e do nível de suscetibilidade em relação á área. Como legenda, à direita estão os valores da área calculados para os genitores, no experimento I..... 35
- Figura 12. Representação gráfica da correlação entre as avaliações de carvão em cana-de-açúcar. As 25 avaliações estão representadas na diagonal com o número das respectivas realizadas ao longo de 253 dias. As cores mais quentes representam maior distância entre as correlações. Em bege estão valores de 1-0,97; amarelo claro 0,96-0,93; amarelo 0,92-0,86; laranja claro 0,85-0,82; laranja 0,81-0,69 e vermelho 0,68-0,58..... 37
- Figura 13. Distribuição dos dados de AACPD (BLUPs) na progênie F₁ oriunda do cruzamento entre os genitores SP81-3250 e RB925345, representada a frequência de genótipos com os valores da área. Indicação da curva de tendência dos valores de AACPD (BLUPs) e do nível de suscetibilidade em relação á área. Como legenda à direita estão os valores da área calculados para os genitores, no experimento II..... 40
- Figura 14. Representação gráfica da correlação entre as avaliações de carvão em cana-de-açúcar. As 25 avaliações estão representadas na diagonal com o número das respectivas realizadas ao longo de 198 dias. As cores mais quentes representam maior distância entre as correlações. Em bege estão valores de 1-0,95; amarelo claro 0,94-0,90; amarelo 0,89-0,78; laranja claro 0,77-0,69; laranja 0,68-0,58 e vermelho 0,57-0,38..... 41
- Figura 15. Avaliação de marca simples para todos os marcadores microssatélites com segregação de marca única (1:1 e 3:1), as marcas estão indicadas na ordem em que aparecem nos grupos de ligação. Os números indicados abaixo são dos grupos de ligação, seguidos de marcadores não ligados. Na vertical estão os valores de LOD score com correção de Bonferroni a 5%, indicando o valor limiar de LOD score, 3. As cores indicam as avaliações de 1-25. Também está indicado o marcador que foi significativo..... 45

Figura 16. Avaliação de marca simples para todos os marcadores microssatélites com segregação de marca única (1:1 e 3:1), as marcas estão indicadas na ordem em que aparecem nos grupos de ligação. Os números indicados abaixo são dos grupos de ligação, seguidos de marcadores não ligados. Na vertical estão os valores de LOD score com correção de Bonferroni a 5%, indicando o valor limiar de LOD score, 3. As cores indicam as avaliações de 1-25. Também está indicado o marcador que foi significativo..... 46

LISTA DE SIGLAS

AACPD	Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença
AUDPC	Area Under the Disease Progress Curve
BLUPs	Best Linear Unbiased Prediction
cM	centiMorgan
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EST-SSR	Expressed Sequence Tag – Simple Sequence Repeat
g-SSR	Genomic – Simple Sequence Repeat
GFP	Green Fluorescence Protein
GL	Grupo de Ligação
h^2	Herdabilidade
LOD	Logarithm of the odds
MDU	Marca de Dose Única
QTL	Quantitative Trait Loci
rf	Fração de recombinação
RNAseq	Ribonucleic acid – sequencing
SM	Simple Marker
SSR	Simple Sequence Repeat
<i>S. scitamineum</i>	<i>Sporisorium scitamineum</i>
VAMP	Vesicle-Associated Membrane Protein

MAPEAMENTO DE QTL PARA RESISTÊNCIA A *Sporisorium scitamineum* EM POPULAÇÃO BI-PARENTAL DE CANA-DE-AÇÚCAR

Autor: BIANCA ROCHA SILVEIRA

Orientador: Prof. Dr. MONALISA SAMPAIO CARNEIRO

RESUMO

A cana-de-açúcar é uma cultura de grande importância econômica mundial, em especial para o Brasil. O país é o maior produtor da cultura e dos seus subprodutos, açúcar e álcool. A cana-de-açúcar vem recebendo atenção para a geração de eletricidade. Visto a importância do setor sucroenergético, há a necessidade de aumentar sua produção agrícola. Esta cultura está exposta a várias doenças, causadas por fitopatógenos, que prejudicam a produção da cultura. A doença do carvão é uma delas, causada pelo fungo *Sporisorium scitamineum*, tornando variedades suscetíveis menos produtivas e podem causar perda de até 100% da plantação. Variedades mais produtivas, com resistência a maior número de doenças, obtidas em menor tempo são enfoque em programas de melhoramento. O trabalho tem por objetivo encontrar marcadores moleculares microsatélites (SSR) associados à resistência da cana-de-açúcar ao fungo *S. scitamineum*. Foi utilizada uma população F₁ (SP81-3250 x RB925345), composta por 238 genótipos. Foi feita a inoculação artificial de toletes de cana-de-açúcar na população por meio de injeção de teliósporos. Os toletes foram mantidos em casa de vegetação, sendo que 25 avaliações foram realizadas entre janeiro e setembro de 2014 para o experimento I e agosto de 2015 a fevereiro de 2016 para o experimento II, visando identificar a incidência da doença. Foram feitas análises moleculares e construção do mapa de ligação, pela genotipagem com marcadores SSR, o qual possibilitou a construção de mapa de ligação com 128 marcas ligadas, gerando 49 grupos de ligação com comprimento total de 1297,68 cM. Para os dados referentes à incidência de carvão foi utilizado o cálculo da área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), normalizados para valores de BLUPS. A análise permitiu observar uma população com maior número de genótipos tolerantes no experimento I e pouca doença no experimento II. Além disso, foi notado que para o experimento I, da 10^a à 25^a avaliação, os resultados tinham alta correlação, o mesmo não se repetiu para o experimento II. O experimento II apresentou baixa incidência em todos os genótipos da população e nos padrões em estudo. Esta diferença de incidência entre os dois experimentos provavelmente ocorreu pela diferença de condições de temperatura a qual eles foram expostos, sendo que o experimento I foi montado no verão com um início de temperatura mais alta e o experimento II começou com temperaturas amenas e que foram aumentando com o tempo, o mesmo ocorre para a incidência da doença. A associação entre fenótipo e genótipo foi realizada através da análise de variância, convertido para LOD Score. Foi possível verificar um marcador EST-SSR, SCB 370, que foi significativo (LOD > 3), explicando em 5% da variação fenotípica para o experimento I.

QTL MAPPING FOR RESISTANCE TO *Sporisorium scitamineum* IN POPULATION BI-PARENTAL OF SUGARCANE.

Author: BIANCA ROCHA SILVEIRA

Adviser: Prof. Dr. MONALISA SAMPAIO CARNEIRO

ABSTRACT

The sugarcane is a major global economic importance culture, especially for Brazil. The country is the largest producer of culture and its by-products, sugar and alcohol. The sugarcane has received attention for the generation of electricity. Since the importance of the sugar-energy sector, there is a need to increase agricultural production. This culture is exposed to various diseases caused by pathogens that impair the production of culture. Coal disease is one of them, caused by the fungus *S. Scitamineum*, making it less susceptible productive varieties and can cause loss of up to 100% of the plantation. More productive varieties with resistance to more diseases, obtained in less time are focused on breeding programs. The study aims to find microsatellite markers (SSR) associated with resistance of sugarcane to the fungus *S. scitamineum*. It used an F₁ population (SP81-3250 RB925345 x) composed of 238 genotypes. Artificial inoculation of sugarcane stalks of the population through telia injection was made. The billets were kept in a greenhouse, and 25 were carried out between January and September 2014 for the first experiment and August 2015 to February 2016 for the experiment II, to identify the incidence of the disease. Molecular analysis and construction of linkage map were made by genotyping with SSR markers, which enabled the construction of linkage map with 128 brands linked, generating 49 linkage groups with a total length of 1297.68 cm. For data on the incidence of coal was used to calculate the area under the disease progress curve (AACPD), normalized to BLUPS values. The analysis allowed us to observe a population with more tolerant genotypes in experiment I and little disease in experiment II. In addition, it was noted that for the first experiment, the 10th to the 25th evaluation, the results were highly correlated, it was not repeated for the second trial. Experiment II showed low incidence in all genotypes of the population and patterns in the study. This incidence difference between the two experiments probably occurred by the difference in temperature conditions to which they were exposed, and the first experiment was set up in the summer with a starting temperature higher and the second trial began with mild temperatures and were increasing with time, the same occurs for the incidence of the disease. The association between phenotype and genotype was performed by analysis of variance, converted to LOD score. It was possible to verify an EST-SSR marker, SCB 370, which was significant (LOD > 3), explaining in 5% of the phenotypic variation for the experiment I.

1 INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) é uma cultura de importância mundial a qual chama atenção por ser capaz de armazenar alto teor de sacarose em seus colmos (TANIGUTI et al., 2015). O Brasil é grande produtor de açúcar e álcool (bioetanol), e mais recentemente também vem recebendo destaque para a produção de eletricidade a partir de seu bagaço (GIANOTTO et al., 2011; WEI et al., 2006). O principal foco dos programas de melhoramento de cana-de-açúcar é encontrar variedades produtivas, com elevado teor de açúcar, e resistentes às principais doenças que acometem a cultura (AITKEN et al., 2008; TANIGUTI et al., 2015).

Uma das importantes doenças da cana-de-açúcar é o carvão, causada pelo fungo *Sporisorium scitamineum*, presente nas regiões do mundo onde se cultiva a cana-de-açúcar (QUE et al., 2014). Os danos econômicos em função do carvão são significativos, podendo causar perda de até 100% da plantação (TOKESHI, 1997). O método mais eficaz e barato para o controle do carvão é com uso de variedades resistentes (BERGAMIN et al., 1987). Trata-se de uma doença de fácil identificação e sua principal característica é a formação de chicotes, uma estrutura composta pelo acúmulo de teliósporos do fungo causador da doença no meristema apical da planta. Esta é observada desde que ocorra a infecção do meristema apical pelos micélios secundários do fungo, os quais irão se transformar em teliósporos (TANIGUTI et al., 2015). Os esporos também são responsáveis por fazer a disseminação da doença, que é realizada principalmente pelo vento.

Doenças apresentam interação entre patógeno e hospedeiro. O conhecimento desta interação é importante para conhecer os mecanismos de ataque do patógeno e de resistência do hospedeiro, tais como: quais são os genes ativados, quais proteínas produzidas, qual modo de ação de ambas as partes dentre outras respostas físicas, bioquímicas e mecânicas (BERGAMIN et al., 1995). A Teoria gene-a-gene de Flor (1942) explica um pouco destas interações, aonde Flor defende que para cada gene de resistência no hospedeiro, há um gene complementar no patógeno, logo, variedades resistentes seriam aquelas que possuem esta correspondência genética (CAMARGO, 1995).

Neste cenário, podem ser utilizados marcadores moleculares que auxiliam no melhor entendimento do complexo genoma da cana-de-açúcar e dos seus componentes genéticos, podendo essa informação ser empregada na seleção de

variedades resistentes a doenças em cana. Uma estratégia alternativa seria utilizar variedades de cana-de-açúcar geneticamente modificada com genes que conferem maior produtividade e resistência as principais doenças (GIANOTTO et al., 2011; LAKSHMANAN et al., 2005). Ferramentas biotecnológicas ainda podem permitir um maior conhecimento da interação entre patógeno e cana-de-açúcar, tais como genes ativados na infecção, respostas do hospedeiro, estratégias de proteção da planta e de ataque do fungo causador da doença (CHEN et al., 2012; SUNDAR et al., 2012).

O mapeamento de QTLs (*Quantitative Trait Loci*) em cana-de-açúcar é de grande importância para compreensão da arquitetura genética de caracteres quantitativos e aperfeiçoamento dos programas de melhoramento. Tais estudos podem ser conduzidos visando encontrar associação entre marcadores moleculares e caracteres quantitativos de interesse, como por exemplo, a resistência da cana-de-açúcar ao carvão (BUTTERFIELD, 2007; MORAIS, 2013; RABOIN et al., 2003; RABOIN et al., 2006; WEI et al., 2006). Para obter informações sobre locos que estão envolvidos com a resistência a doenças é necessário adotar várias estratégias, tais como: determinar condições ideais para que estes genes sejam expressos, permitindo melhor estudo sobre a doença (KRUGNER, 1995); utilizar vários marcadores moleculares, amplamente distribuídos no genoma, possibilitando maior cobertura do mapa genético e podendo facilitar a identificação de QTL (AITKEN et al., 2008; MORAIS, 2013; OLIVEIRA et al., 2009). Além disso, é necessária a realização de experimentos a campo ou casa de vegetação que visem avaliar o progresso da doença na progênie.

Neste estudo, foram utilizados marcadores moleculares microssatélites para identificar associação com resistência da cana-de-açúcar ao fungo *S. scitamineum* causador da doença do carvão. Para isto foi utilizada uma progênie F₁ resultante do cruzamento entre as variedades SP81-3250 e RB925345, que foi inoculada com fungo em experimentos conduzidos em casa de vegetação em diferentes épocas do ano.

2 OBJETIVOS

2.1. Geral

Identificar marcadores moleculares microssatélites associados com resistência ao fungo *S. scitamineum*, causador do carvão em cana-de-açúcar.

2.2. Específicos

- a) Construir mapa genético com marcadores moleculares microssatélites a partir de progênie F_1 de um cruzamento bi-parental de cana-de-açúcar;
- b) Avaliar, em casa de vegetação, a resposta dos indivíduos da progênie F_1 de cana-de-açúcar a infecção pelo fungo *S. scitamineum*;
- c) Identificar associação significativa entre os marcadores microssatélites e resposta de resistência/suscetibilidade.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Cultura e melhoramento da cana-de-açúcar

Atualmente, o Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar sendo processadas 665,6 milhões de toneladas na safra de 2015/2016, e também um dos maiores exportadores dos seus subprodutos. Além de crescente interesse em utilizar a cana-de-açúcar como fonte de energia renovável para a geração de eletricidade. A área cultivada no país destinada à atividade sucroenergética é de 8,7 milhões de hectares, sendo o estado de São Paulo o maior produtor, com 52% da área plantada. Em relação à produtividade, a safra de 2015/16 apresenta um aumento de 9,1% em relação à safra passada, com produção de 76.909 kg/ha. Essa safra gerou uma produção de açúcar de 33,49 milhões de toneladas e 30,5 bilhões de litros de etanol (CONAB, 2016; UNICA, 2015). Na safra de 2014/2015 o PIB do setor sucroenergético somou cerca de US\$ 43 bilhões para o país, o que equivale a 2% do PIB nacional. Além do dinheiro que circula neste setor, ele também gera muitos empregos, sendo que o setor produtivo é responsável por cerca de 900 mil empregos diretos, e mais 70 mil de produtores rurais independentes, segundo dados da UNICA (2015).

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) pertence à espécie herbácea, é uma planta alógama, da família das gramíneas (Poaceae), tribo Andropogoneae e gênero *Saccharum*. Grande parte dos autores admite que este gênero seja constituído por seis espécies distintas, sendo elas, (1) selvagem: *S. spontaneum* ($2n = 40-128$), e (2) nobres: *S. barberi* ($2n = 81-124$), *S. robustum* ($2n = 60-80$), *S. edule* ($2n = 60-80$), *S. officinarum* ($2n = 80$) e *S. sinensis* ($2n = 111-120$) (IRVINE, 1999). São aceitos ainda o envolvimento de outros gêneros próximos, tais como *Erianthus*, *Miscanthus*,

Narenga e *Sclerostachya*, relacionados à *Saccharum* com alguma contribuição ainda que pequena, para o desenvolvimento das espécies de cana, sendo que todos juntos formam o complexo *Saccharum* (DANIEL; ROACH, 1987). Trata-se de uma espécie de clima tropical e subtropical a qual o desenvolvimento está intimamente ligado a fatores ambientais, como temperatura e umidade. A cana-de-açúcar apresenta maiores taxas de crescimento e acúmulo de biomassa com faixa de temperatura entre 22°C e 30°C, acima de 38°C o acúmulo e crescimento se tornam nulos e restritos a temperatura inferior a 19°C (CARVALHO; FURTADO, 2013). Altas temperaturas são responsáveis por favorecer o florescimento e a presença de plantas daninhas, insetos e doenças (como carvão e raquitismo da soqueira, por exemplo), enquanto baixas temperaturas faça com que haja o acúmulo de sacarose no colmo da planta (CHANDIPOSHA, 2013).

Inicialmente clones de *S. officinarum* foram os mais plantados, por apresentar alta quantidade de sacarose. A partir de 1888, os programas de melhoramento eram realizados por cruzamentos intraespecíficos nesta espécie (MACHADO, 2000). Porém, mesmo com a produção de variedades melhoradas, o que se observava era a alta suscetibilidade a doenças nas variedades resultantes dos cruzamentos intraespecíficos de *S. officinarum* (NUNES, 2013; OLIVEIRA, 2007). Este fato incentivou a realização de cruzamentos interespecíficos, aos quais se cruzaria um genitor de variedade descendente de canas selvagens, *S. spontaneum*, resistente a maioria das doenças, e o outro, descendente de canas nobres, com alto teor de sacarose, *S. officinarum* (CESNIK; MIOCQUE, 2004). Visto que as duas espécies possuem números variados de cromossomos, as variedades de cana-de-açúcar derivadas destes cruzamentos apresentam alto número de ploidia e aneuploidia, podendo variar de 80 a 130 cromossomos. Destes, estima-se que a maioria seja originada de *S. officinarum*, 10-25% de *S. spontaneum* e uma pequena porcentagem de recombinação entre eles (BORÉM et al., 2012; D'HONT et al., 1998).

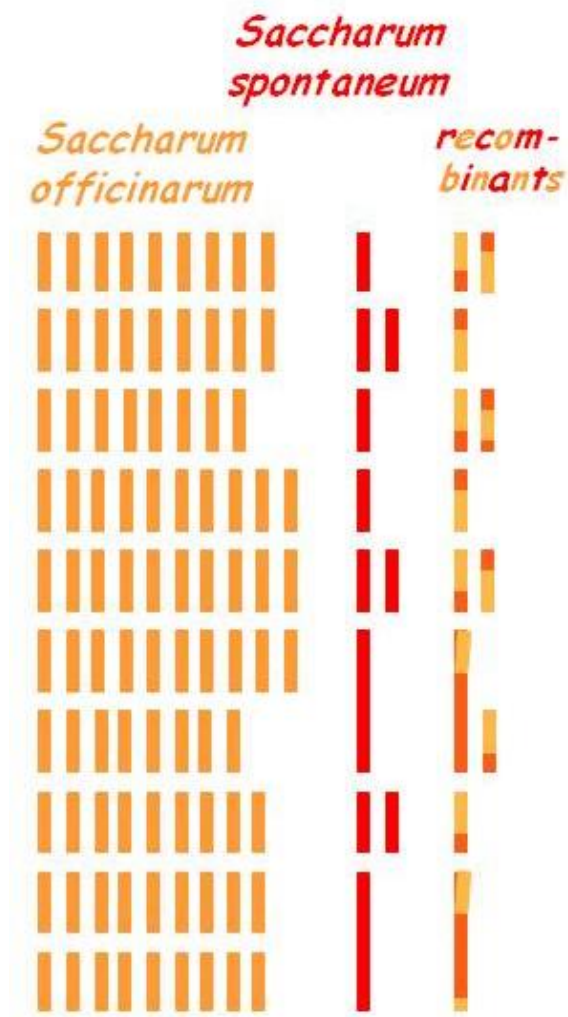


Figura 1. Composição genética de variedades modernas, demonstrando que a maior porção dos cromossomos teve origem em *S. officinarum*, seguido por *S. spontaneum* em pequena quantidade e ainda, cromossomos recombinantes. (Fonte: umr-agap.cirad.fr)

Em vista da constituição genética da cana-de-açúcar é possível notar que o genoma dela é muito complexo por se tratar de uma cultura caracterizada por ser poliploide, e apresentar aneuploidia. Para desenvolver novas variedades do modo convencional são realizadas várias fases de seleção e clonagem de genótipos superiores oriundos a partir de cruzamento entre indivíduos contrastantes para características de interesse, sendo necessários testes e seleções. Inicialmente, são selecionadas variedades como parentais para fazer cruzamentos, com intuito de obter genótipos superiores na progênie (GIANOTTO et al., 2011). Com o cruzamento, são geradas milhares de progênies que são observadas inicialmente como plântulas e depois são transplantadas para campo. O processo de

melhoramento é demorado e caro, variando de 12 a 15 anos para se chegar a uma variedade nova (GOUY et al., 2015).

Sendo assim, ferramentas biotecnológicas como o uso de marcadores moleculares são importantes visto que podem auxiliar a compreensão genética e molecular do genoma da cana-de-açúcar e com isso acelerar as fases do programa de melhoramento. As informações geradas podem desvendar esse complexo genoma e permitir auxiliar na determinação do melhor momento para estudar determinadas doenças, além na escolha de variedades como parentais em programas de melhoramento, sendo possível, a partir destas técnicas, reconhecer precocemente variedades que conferem determinadas características de interesse, tais como maior teor de sacarose, resistência a doenças (BARBOSA; SILVEIRA, 2012; BORÉM et al., 2012).

A cultura da cana-de-açúcar é acometida por uma série de doenças, causadas por inúmeros fitopatógenos, dentre eles fungos, bactérias, vírus ou nematoides. No Brasil, algumas doenças como mosaico (*Sugarcane mosaic vírus*), carvão (*S. scitamineum*), ferrugem marrom (*Puccinia melanocephala*), escaldadura (*Xanthomonas albilineans*), raquitismo da soqueira (*Leifsonia xyli* subsp. *xyli*) já causaram grandes prejuízos nas plantações de cana-de-açúcar (TOKESHI, 1997), dentre ela se destaca o carvão, capaz de gerar danos de até 100% na produção.

3.2. O carvão em cana-de-açúcar

O carvão é causado pelo *S. scitamineum*, fungo do filo Basidiomycota, classe Ustilaginomycetes, ordem Ustilaginales e família Ustilaginaceae (HAUKSWORTH et al., 1995). O patógeno é um fungo de parte aérea, visto que ataca a parte aérea da planta – como caule, folha, inflorescência, flor e semente –, é hospedeiro-específico que ataca gemas jovens. É classificado como biotrófico uma vez que depende do hospedeiro para sobreviver por se alimentar de células vivas; de juros simples por apresentar infecção tardia, já que as plantas infectadas não são fonte de inóculo para mesma cultura. Sendo assim, a infecção depende do inóculo inicial o que caracteriza uma doença monocíclica; e causa infecção sistêmica, ao longo de toda a planta (BERGAMIN, 1995; SUNDAR et al., 2012; TOKESHI, 1997).

Este patógeno possui micélios que invadem o tecido meristemático da planta, causando infecções que só ocorrem se houver a germinação dos teliósporos e fusão de hifas haploides (micélio primário) compatíveis sexualmente, ocorrendo assim à

formação de hifas dicarióticas infectivas (micélio secundário) as quais penetram na base das escamas das gemas e atingem o tecido meristemático, se transformando em teliósporos (Dos REIS, 2012; MORAIS, 2013; RAGO, 2005; TANIGUTI et al., 2015).

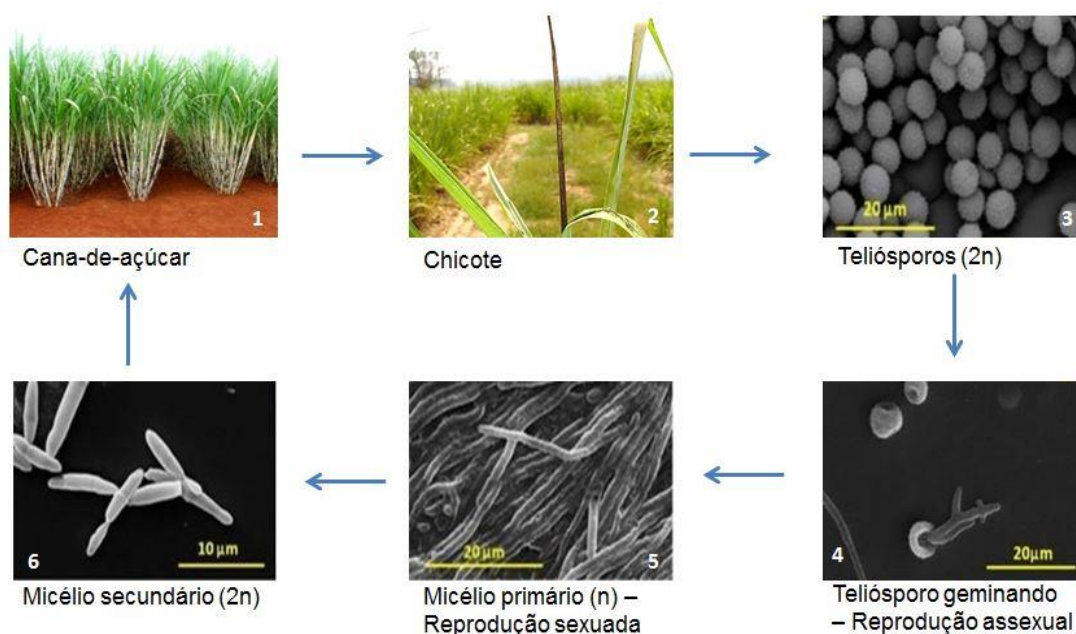


Figura 2. Ciclo do carvão em cana-de-açúcar. 1) Planta de cana-de-açúcar em campo, 2) surgimento do chicote, sintoma e sinal do carvão, 3) teliósporos liberados da planta, 4) germinação dos teliósporos, ocorrência da meiose e formação de probasídios haploides, 5) formação de micélio primário a partir dos basidiósporos e fusão de micélios primários compatíveis, 6) micélios secundários, irrá infectar a planta sadia. Fonte: Dos Reis, 2012; PMGCA/UFSCar, 2016.

Modificações genéticas no patógeno faz com que se crie uma nova raça, podendo torná-lo virulento a uma variedade que se caracterizava como resistente a ele. *S. scitamineum* é um fungo que apresenta tanto a reprodução assexuada quanto a sexuada, o que lhe confere maior variabilidade genética, podendo ser diferenciado em raças (WU et al., 1988). É possível que um fungo de uma raça que causa a doença em um ambiente, não seja capaz de causar a doença em um ambiente diferenciado. Assim como, uma variedade que se mostrava resistente pode apresentar a doença caso haja variabilidade genética do fungo e uma nova raça surja naquele lugar. Além do mais, os níveis de agressividade do patógeno podem causar diferentes níveis de doença (RAGO et al, 2009; SINGH et al., 2005; SUNDAR et al., 2012; TOKESHI, 1997; WU et al., 1988; ZHANG et al., 2015).

A doença é caracterizada principalmente pelo aparecimento de chicotes, havendo anterior a isto a redução no diâmetro e desenvolvimento dos colmos, perdas no

conteúdo de sacarose. Antes de surgir o chicote, as folhas ficam mais pontiagudas, com o limbo foliar estreito e curto, e as touceiras apresentam superbrotamento. Os fungos são encontrados principalmente em células parenquimáticas, sendo o chicote o sinal da doença com aparência de “cinzas de carvão” pela planta, em especial nas folhas. Esta estrutura é composta pelo acúmulo de hifas na base e teliósporos no ápice, sendo assim os esporos são formados na base das folhas (CARVALHO et al, 2016; MARQUES et al., 2016). Inicialmente há o acúmulo de micélio secundário no meristema apical, o qual se transforma em teliósporos e se junta na região apical na planta, com isso, a planta alonga o entrenó e o meristema apical faz parte da formação do chicote. Neste momento é formada uma capa prateada ao redor dos esporos e quando esta se rompe, os esporos são disseminados (Dos REIS, 2012; MORAIS, 2013). Os chicotes surgem em plantas a partir de 2 meses de idade, com seu máximo ocorrendo quando as plantas possuem de 6-7 meses de idade (CROFT et al., 2008; Dos REIS, 2012; FERREIRA; COMSTOCK, 1989; TOKESHI, 1997). Os teliósporos podem se disseminar pelo vento, sendo capazes de infectar facilmente plantas susceptíveis e chegar a causar perda de toda a plantação. As perdas estão relacionadas à produção da cana-de-açúcar, queda do teor de sacarose, colmos finos e mais fibrosos, queda da qualidade do sulco e do número de colmos utilizáveis para industrialização (BUENO, 2010; CARVALHO et al, 2016; QUE et al., 2014; RAGO et al., 2009; SUNDAR et al., 2012; TOKESHI, 1997).



Figura 3. Plantas com sintomas. a) chicote, b) superbrotamento, c) Planta sadia, d) Planta doente com sintomas. (Fonte: Arquivo pessoal).

Os níveis de doença para o carvão em cana-de-açúcar podem ser empregados considerando a incidência ou a severidade. A incidência é a contagem do número de

plantas doentes, expressa a frequência de plantas doentes ou partes de plantas doentes em uma amostra ou população e pode ser empregado em casa de vegetação ou campo. Já severidade é mais utilizada em campo, é a média de plantas amostradas, como por exemplo, plantas doentes por parcela (AMORIM, 1995). Utiliza-se a classificação como resistentes, moderadamente suscetíveis (intermediária) e altamente suscetíveis (suscetíveis) (CHAO et al., 1990; WU et al., 1988), sendo que independente da classificação a colonização sempre ocorre em plantas infectadas, como mostraram os estudos conduzidos por Carvalho et al. (2016) e Schaker et al. (2016) através de proteína fluorescente (GFP – *Green Fluorescence Protein*) e RNAseq transcriptômico, respectivamente. Também é considerada a tolerância quando a avaliação leva em conta a produção, sendo que variedades tolerantes seriam aquelas que apresentam a doença, porém isto não diminui a produção da planta (BERGAMIN et al., 1995).

Vários são os fatores que interferem na infecção e no aparecimento da doença tanto em campo, tais como: suscetibilidade da variedade a qual pode ou não ter uma predisposição genética para que ocorra a doença; virulência do patógeno, o qual igualmente à variedade pode causar a doença ou não, desde que haja condições ambientais para que isto ocorra; idade da gema sendo que gemas mais novas são mais suscetíveis à doença; concentração de teliósporo uma vez que quanto maior a quantidade, maior a chance de ocorrer a doença; condições do solo, pois se este for fraco em nutrientes, conseqüentemente a planta também enfraquecerá e possibilitará mais facilmente a infecção; calor, uma vez que altas temperaturas favorecem o processo de infecção do *S. scitamineum* e umidade o qual interfere diretamente no ciclo da doença, ao permitir germinação do fungo. (BERGAMIN et al., 1995; BORRÁS-HIGALGO et al., 2005; BUENO, 2010; TOKESHI, 1997). Em casa de vegetação, os fatores que se destacam são a suscetibilidade da planta e temperatura, uma vez que os demais fatores são controlados e iguais para todas as variedades em estudo (RABOIN et al., 2003).

A faixa de temperatura ótima para que ocorra a infecção é indicada como de 17 a 35°C para a germinação dos teliósporos e de 23 a 32°C para a produção de basidiósporos (BERGAMIN et al., 1987; BUENO, 2010), sendo indicada a temperatura ótima para a formação de micélio secundário a 31°C (BOCK, 1964; JUANGBHANICH; WANGWON, 1983; BHUIYAN et al., 2012; WALLER, 1970) e incubação da planta a 28°C \pm 0,5°C após a inoculação artificial visto que esta

temperatura apresenta uma melhor resposta em porcentagem de brotação das gemas e no surgimento de incidência da doença (BOLDRINI, 2016; QUE et al., 2009; QUE et al., 2014). Por ser uma doença de juro simples estes fatores podem influenciar no surgimento da doença, pois irá permitir o desenvolvimento do patógeno para um próximo ciclo de infecções em campo, e em casa de vegetação, irá possibilitar com que o *S. scitamineum* inoculado tenha condições favoráveis para se desenvolver e infectar a planta (BERGAMIN et al., 1995; RABOIN et al., 2003).

Não são apenas fatores genéticos que determinam o surgimento ou não de uma doença na planta. Em um mesmo ambiente podem estar presentes o fungo e o hospedeiro, porém não estar em condições de temperatura e umidade adequadas para que ocorra a doença. O ambiente pode estar diretamente ligado tanto ao patógeno quanto ao hospedeiro e por ambiente entendem-se fatores relacionados ao clima, solo e cultivo, tais como umidade, temperatura, vento, nutrição, poda, dentre outros (BEDENDO, 1995). No carvão, o vento é o responsável pela disseminação dos teliosporos e conseqüentemente, do fungo causador da doença, como dito anteriormente. A umidade é a responsável pela germinação dos teliosporos, permitindo dar continuidade ao ciclo da doença, enquanto a temperatura está diretamente relacionada com a colonização e reprodução do fungo na cana-de-açúcar. Sendo assim, em campo, uma variedade pode se apresentar resistente a determinada doença em um ambiente, que não favoreça o patógeno, e suscetível em outro o qual pode não favorecer o desenvolvimento da planta e favoreça o patógeno (BEDENDO, 1995). Em casa de vegetação, a temperatura quando elevada pode favorecer com o fungo se desenvolva e colonize, já que solo e umidade são controlados para todas as plantas.

O controle do carvão é feito principalmente com uso de variedades resistentes como genitoras em programas de melhoramento, este método é o mais barato e fácil e apresenta vantagens por não agredir o meio ambiente, nem o produtor e consumidor. Outras medidas também são adotadas, como tratamento químico ou térmico, "roguing" e rotação de cultura, o ideal seria unir a resistência à doença com alta produtividade da planta (BERGAMIN et al., 1995; BESPALHOK et al., 2007; FERREIRA; COMSTOCK, 1989; TOKESHI, 1997). É de suma importância o conhecimento da base genética da resistência da cana-de-açúcar ao carvão.

Trabalhos já realizados mostram que a herdabilidade da resistência da cana-de-açúcar ao carvão é moderada. Chao et al. (1990) estudaram a herdabilidade da

resistência da cana-de-açúcar para o carvão, que foi estimada em 0,41 para cana planta e 0,38 para cana-soca. Raboin (2003) calculou herdabilidade de 0,68 em cana planta e 0,75 em cana-soca, Wu et al. (1988) estudou em campo, herdabilidade para duas raças da doença, sendo de 0,51 para raça A e 0,47 para raça B. Morais (2013) calculou em seu trabalho, valores de 0,54 para o primeiro ano de avaliação e 0,35 para o segundo, ambos avaliados em casa de vegetação. Estudo de Chao et al. (1990) mostrou que a progênie de um cruzamento de duas variedades resistentes apresentam maior frequência de genes com resistência à doença. Desta forma, é possível fazer o controle genético do carvão da cana-de-açúcar ao utilizar variedades resistentes como parentais em programas de melhoramento.

A avaliação da resistência à doença pode ser feita através da inoculação artificial do fungo *S. scitamineum* na planta. Os métodos utilizados em programas de melhoramento genético da cana-de-açúcar para fazer a inoculação artificial são: aspersão de teliosporos, imersão de gemas intactas ou feridas em suspensão de teliosporos, inoculação por injeção de teliosporos nas gemas e distribuição de pasta de teliosporos sobre gemas com ou sem ferimentos. Dentre eles, os mais utilizados são os métodos de imersão e injeção de teliosporos (DALVI et al., 2012; Dos REIS, 2012; RABOIN et al., 2003).

A imersão em suspensão de teliosporos utiliza de uma a três gemas e as coloca em suspensão contendo água e esporos a uma concentração de 2.5×10^6 a 5×10^8 teliosporos/mL, sendo que a principal característica deste método é não agredir a planta e a infecção causada é de forma natural (FERREIRA; COMSTOCK, 1989). Esta metodologia é a mais próxima de condições naturais e a mais indicada em caso de seleção de genótipos resistentes (BOLDRINI, 2016). No caso da injeção de teliosporos, é preparada suspensão viscosa de água e esporos com uma concentração de 5×10^6 esporos/mL, a qual é inserida dentro da planta a partir da base da gema, por duas agulhas (PEROS; BAUDIN, 1983), a infecção não é natural e segundo Raboin et al. (2003) que testou diferentes métodos de inoculação em casa de vegetação, com esta metodologia a doença é mais eficiente do que o método anterior, apresentando assim, maior infecção. Esta metodologia é indicada quando o objetivo for escolher genitores resistentes, os quais possuam resistência genética (BOLDRINI, 2016). O patógeno é inserido de forma agressiva na planta, quebrando de imediato a resistência morfológica presente na gema (AMORIM et al.,

2000; MORAIS, 2013).

Sendo assim, ao conduzir estudos com fitopatologia, deve-se conhecer bem a doença, tanto o patógeno – conhecendo seu ciclo, modo de ação e condições que o favorecem – como o hospedeiro. A fim de avaliar a doença, é necessário estabelecer condições ótimas no experimento para que ela ocorra. Em casa de vegetação, o carvão da cana-de-açúcar se manifesta nas plantas em condições de elevada temperatura e umidade, sendo que os sintomas demoram a aparecer por se tratar de uma doença de juros simples, conforme explicado anteriormente (BUENO, 2010; BERGAMIN et al., 1995).

Na literatura é possível observar que a maioria dos experimentos realizam suas avaliações de doenças após um período de clima quente. Estudos com o carvão no milho, uma cultura também das gramíneas cujo genoma é mais conhecido do que da cana-de-açúcar, apresentam diferentes épocas de avaliação, como de Ding et al. (2008) em que a avaliação foi realizada no mês de junho. Lubberstedt et al. (1999) também realizaram avaliações em 4 anos consecutivos, sendo que os resultados foram todos similares, exceto no ano em que houve temperaturas mais baixas e maior precipitação no inverno. Isto resultou em avaliações com número muito baixo de doença em comparação aos demais anos. Em cana-de-açúcar, há pesquisas realizadas em centros de pesquisa no hemisfério sul, tais como na África do Sul e Austrália com o carvão da cana-de-açúcar. Raboin et al. (2003) conduziram experimento em campo com inoculação artificial por imersão, os quais foram plantados em novembro e setembro de diferentes anos. Neste estudo foi identificada associação entre marcadores e a doença do carvão e, que muitos marcadores possuem pequenos efeitos para conferir resistência ao carvão em cana-de-açúcar, explicando no estudo de 3 a 12% da variação fenotípica. Já o Cox et al. (2011), na Austrália, optaram pelo plantio dos toletes inoculados artificialmente, em maio/junho de um ano para avaliações em novembro/dezembro e em fevereiro e março de outro ano para avaliações em outubro e novembro para testar diferentes métodos de inoculação. Cox et al. (2011) defendem que mais estudos precisam ser realizados para o uso destas metodologias em busca de utilizá-las na obtenção de novas variedades de cana-de-açúcar.

Uma forma de analisar a resistência do carvão em cana-de-açúcar é calculando a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD ou AUDPC – *Area Under Disease Progression Curve*), como utilizado em vários trabalhos com este segmento

(RAGO, 2005; RAGO et al., 2009; MORAIS, 2013). Este cálculo é uma análise estatística que permite verificar o comportamento da doença pela curva de progresso dela. Isto é possível a partir do modelo matemático que melhor se ajusta à doença em estudo, no caso do carvão, este modelo é o monomolecular (BERGAMIN, 1995). Este modelo calcula a velocidade de aumento da doença, a qual para o carvão é proporcional ao inóculo inicial. Isto se dá, por se tratar de uma doença de juro simples, como dito anteriormente, visto que a sua velocidade de aumento não tem relação com a quantidade de doença em cada instante, mas depende do contato efetivo entre patógeno e hospedeiro em um momento inicial. O cálculo de AACPD é realizado então, pela contagem de duas avaliações seguidas, considerando o tempo em cada uma (equação 1) (BERGAMIN, 1995; CAMPBELL; MADDEN, 1990), o que permite identificar interações entre patógeno, hospedeiro e ambiente. Esta equação leva em consideração como parâmetros a época do início da epidemia, a quantidade do inóculo inicial, a taxa de aumento da doença, a forma da curva de progresso da doença, a área sob esta curva – que é de fato calculada –, a quantidade máxima e final da doença e duração da epidemia (AMORIM; BERGAMIN, 1991; AMORIM et al., 1993).

3.3. Mapa genético e Mapeamento de QTL em cana-de-açúcar

Com os avanços da genética e da biologia molecular, em especial o surgimento da tecnologia do DNA recombinante, da reação em cadeia de polimerase (PCR - *Polymerase Chain Reaction*) e do sequenciamento automático do DNA, foram desenvolvidas poderosas técnicas para o desenvolvimento de marcadores genéticos úteis na identificação, caracterização e avaliação dos recursos genéticos vegetais. Com o desenvolvimento dos marcadores moleculares, algumas limitações foram contornadas, sendo possível detectar polimorfismo em nível do DNA, com maior informação genética por loco, em qualquer idade e tecido da planta (ANONI, 2011; FALEIRO, 2007; FERREIRA; GRATTAPAGLIA; 1998). Para maior conhecimento do genoma da cana-de-açúcar e genes que conferem características de interesse, tais como a resistência ao carvão da cana-de-açúcar, são realizados estudos de mapeamento genético e busca por associações entre marcadores moleculares e característica fenotípica de interesse (Dos SANTOS et al., 2016). Atualmente, em cana-de-açúcar, são utilizados principalmente os marcadores moleculares EST-SSR (*Expressed Sequence Tags - Simple Sequence Repeats* ou microssatélite expresso)

e SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) por serem mais polimórficos, logo mais informativos, podendo apresentar leituras com dosagens 1:1, 3:1 em marcadores SSR e o mesmo para os SNPs, acrescentada da leitura 1:2:1. Os EST-SSR são marcadores microssatélites de sequência expressas presentes em bancos de dados de EST como o SUCEST (*Sugarcane Expressed Sequence Tag Project*), ou seja, são marcadores gerados a partir de bibliotecas gênicas e possuem maior probabilidade de estarem geneticamente associados a uma característica fenotípica pelo fato de se tratar de genes realmente expressos (OLIVEIRA et al., 2009; SOUZA et al., 2011). Apresenta também homologia com genes candidatos, o que facilita mapeamento de QTLs (GARCIA et al., 2006). Apesar de este marcador molecular ser classificado como co-dominante, em cana-de-açúcar atua como marcador dominante, pois só permite identificar polimorfismo em dose única (1:1 ou 3:1). (CORTEZ et al., 2010; FALEIRO, 2007; MORAIS, 2013; PASTINA, 2010).

Mapas genéticos podem ser construídos a partir de marcadores morfológicos, citológicos, isoenzimáticos e de DNA (CARNEIRO; VIEIRA, 2002). A partir do uso de marcadores moleculares podem ser construídos mapas de ligação, que representam a ordem e posição dos genes no genoma. A distância física entre genes é medida em centimorgans (cM) o que equivale à frequência de recombinação entre eles (RAMALHO et al., 2012). Em cana-de-açúcar, a complexidade do seu genoma, dificulta a obtenção de linhagens nesta espécie, sendo assim é utilizada progênie F₁ resultante de cruzamento entre dois genótipos heterozigóticos (MORAIS, 2013). Grattapaglia e Sederoff (1994) desenvolveram a metodologia *pseudo-testcross*, muito utilizado para fazer mapeamento para geração F₁ (ALJANABI et al., 2007; ALWALA et al., 2008). Esta metodologia foi desenvolvida em estudo de mapeamento de eucalipto e por ela são construídos dois mapas, um para cada genitor, no qual utiliza apenas marcas de dose única (MDU) presente em um dos genitores (1:1) (GRATTAPAGLIA; SEDEROFF, 1994).

Com a necessidade de mapas mais saturados, Garcia et al. (2006) ao utilizar diferentes marcadores (RFLP, SSR e AFLP) perceberam que foram geradas 1118 marcas de dose única, das quais 61% segregavam 3:1 e apenas 39% 1:1. Sendo assim, propôs o mapa integrado com base no método de Wu et al. (2002), que utiliza marcas de dose única presente em um dos genitores (1:1) como também em ambos os genitores (3:1). Para a construção de mapas integrados existem alguns programas estatísticos que fazem análise da ligação genética, como JoinMap

(OOIJEN; VOORRIPS, 2001) e o OneMap (GARCIA et al., 2006), que é um pacote dentro do programa estatístico R.

Uma forma de busca destas associações é realizada pelo mapeamento de QTLs, utilizados para identificar regiões cromossômicas que possuem genes que controlam caracteres quantitativos (WU et al., 2002; SCHOTTERER, 2004; MARGARIDO, 2011). Para identificação de QTLs o uso de mapa genético pode ou não ser necessário, variando com a metodologia a ser utilizada (AITKEN et al., 2006; RABOIN et al., 2006; WEI et al., 2006; BUTTERFIELD, 2007; AITKEN et al., 2008). Só é possível fazer um estudo de QTL quando há associação entre o fenótipo e o genótipo da planta. Encontrar QTL significa encontrar no genoma uma posição para um gene que confere relação com o caráter. Com uso de marcadores moleculares é possível identificar no genoma o local onde aquele gene se encontra e quanto ele interfere na característica (GAZAFFI et al., 2010; MAGALHÃES; BRAUNBECK, 2010).

Alguns métodos estatísticos foram desenvolvidos para mapear QTLs, sendo eles: análise para cada marca única (*Single Marker – SM*) (EDWARDS et al., 1987; LYNCH; WALSH, 1998), o qual não necessita de mapa de ligação, faz comparação entre as médias dos fenótipos com diferentes classes de genótipos; mapeamento por intervalo (*Interval Mapping – IM*) (LANDER; BOTSTEIN, 1989), necessita de um mapa genético e identifica a presença de QTL entre dois marcadores adjacentes; mapeamento por intervalo composto (*Composite Interval Mapping - CIM*) (JANSEN; STAM, 1994; ZENG, 1994) o qual utiliza método IM mas acrescenta outros marcadores que não estão no intervalo; e mapeamento de múltiplos intervalos (*Multiple Interval Mapping - MIM*) (KAO et al., 1999), é um aprimoramento do CIM, faz análise simultânea de múltiplos intervalos (MANCINI, 2014; MORAIS, 2013).

Estudos para detecção de QTLs com resistência da cana-de-açúcar a *S. scitamineum* já foram desenvolvidos. Wei et al. (2006) ao realizar estudo com 154 clones de cana-de-açúcar a partir de marcadores 1068 marcadores AFLPs e 141 SSRs correlacionando com doenças de cana-de-açúcar, sendo elas podridão radicular (*Pachymetra chaunorhiza*), escaldadura das folhas (*Xanthomonas albilineans* Dowson), doença de Fiji (*Fiji disease virus*) e carvão (*S. scitamineum*); identificaram 59% de variação fenotípica para resistência ao carvão explicado por 11 marcadores (melhor subconjunto de 4 marcadores explica 53,7 % da variação

fenotípica), 32% da variação fenotípica da escaldadura das folhas e da podridão radicular, explicada por 4 marcas e 26% da doença de Fiji, por 5 marcas.

Outro estudo desenvolvido por Butterfield (2007) foi realizado para identificação de resistência ao carvão e à broca-da-cana (*Eldana saccharina*). Ele utilizou 275 marcadores RFLPs e 1056 AFLPs em 77 genótipos, onde observou 16% da variação fenotípica à resistência da cana-de-açúcar ao carvão explicada por 64 marcas e 20% da variação fenotípica à resistência à broca-da-cana explicada por 115 marcas.

Morais (2013) estudou marcadores EST-SSR, TRAPs, AFLPs e marcadores direcionados ao retrotransposon *sc/vana_1* em uma progênie com 188 genótipos provenientes do cruzamento entre “IAC66-6” e “TUC71-7”. Com este estudo, foram observados oito QTLs associados à resistência ao carvão, seis deles relacionados à diminuição da suscetibilidade e dois ao aumento, explicando individualmente de 3,4% a 5,7% da variação fenotípica. Identificou ainda o marcador PALA1350, associado a um QTL com efeito negativo no fenótipo no primeiro ano de avaliação e no comportamento médio dos genótipos considerando os dois anos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Caracterização da população de mapeamento

O material vegetal foi constituído de uma progênie F_1 composta de 238 indivíduos oriundos do cruzamento bi-parental SP81-3250 x RB925345. Esta população integra o Programa de Mapeamento Genético do Laboratório de Biotecnologia de Plantas do CCA/UFSCAR que envolve tanto a estratégia de mapeamento convencional (população bi-parental, apresentada aqui nesta pesquisa) como a de mapeamento associativo. Essa progênie foi avaliada para características de importância econômica da cana-de-açúcar por 3 anos agrícolas em duas localidades do estado de São Paulo (BALSALOBRE et al., 2016). A variedade RB925345 é susceptível ao carvão e a variedade SP81-3250 resistente à doença.

4.2. Análises moleculares

4.2.1. Extração e quantificação de DNA

Amostras de colmos dos 238 indivíduos da progênie F₁ assim como dos dois genitores foram coletadas em campo, em duplicata e levadas ao Laboratório de Biotecnologia de Plantas, localizado no CCA/UFSCar. O DNA total foi extraído a partir do palmito da cana-de-açúcar, seguindo o protocolo de Aljanabi et al. (1999). Depois de extraídos, os DNAs foram quantificados por eletroforese horizontal em gel de agarose 1%, e então, foram diluídos para concentração final de 100 ng/μL⁻¹ com tampão TE (Tris-HCL e EDTA) e armazenados em freezer -80°C.



Figura 4. Extração de DNA. a) parte do colmo de cana-de-açúcar retirado do campo, b) palmito da cana-de-açúcar para extração, c) cadinhos e bisturis: utilizadas para o processo de maceração mecânica, d) processo de maceração palmito para posteriores etapas de extração do DNA. Fonte: arquivo pessoal

4.2.2. Genotipagem dos marcadores moleculares microsatélites

A genotipagem dos marcadores microsatélites foi realizada durante a tese de doutorado da Melina Mancini (MANCINI, 2014). No presente trabalho, novos marcadores microsatélites foram avaliados na progênie F₁ e acrescentados aqueles já avaliados por Mancini (2014). No total foram utilizados 99 pares de *primers* de microsatélites, sendo 82 oriundos de microsatélites expressos (EST-SSR), e 17 microsatélites genômicos (gSSR) (ANONI et al., 2014; BANERJEE et al., 2015; GADALETA et al., 2011; HU et al., 2011; MANCINI, 2014; ZHOU et al., 2015). Estes locos foram genotipados em toda a população de mapeamento e nos genitores.

As amplificações de DNA foram realizadas no termociclador *Mastercycler Gradient* (Eppendorf) em volume final de 20 μL, contendo 40 ng de DNA molde, 0,50 unidade de Taq DNApolimerase (Invitrogen), 10X tampão PCR (10 mmol.L⁻¹ Tris-HCl e 50 mmol.L⁻¹ KCl) , 100 μmol.L⁻¹ de cada dNTP, 0,20 μmol.L⁻¹ de *primer forward*, 0,20 μmol.L⁻¹ de *primer reverse*, 2 mmol.L⁻¹ de MgCl₂ e água ultrapura. A PCR foi realizada com uma desnaturação inicial de 94°C por 3 minutos, seguido de 30 ciclos composto por: uma desnaturação de 94°C por 1 minuto, hibridização por 1 minuto

(temperatura de hibridização de acordo com cada primer), extensão a 72°C por 1 minuto. Realizada alongação final a 72°C por 3 minutos (OLIVEIRA et al., 2009).

Ao produto da PCR, foram acrescentados 12 µL de tampão desnaturante (formamida contendo 0,8 mmol.L⁻¹ de EDTA, 10 mg de azul de bromofenol e 10 mg de xileno cianol) e em seguida aquecido a 94°C por 5 min para que ocorresse a desnaturação das fitas de DNA. Logo após o processo de desnaturação, as amostras foram imediatamente colocadas em gelo. A separação dos fragmentos foi realizada em gel de poliacrilamida 6% em cuba vertical, 30x42 cm da *C.B.S. Scientific*, por 3 horas com fonte de energia elétrica a 60 W para cada placa. Posteriormente foi corado com nitrato de prata de acordo com Creste et al. (2001). A fixação do gel foi feita por imersão em solução de etanol 10% e ácido acético 1%, agitando por 10 minutos, seguida de lavagem com água destilada, durante 1 minuto. Depois, foi realizada a oxidação, em solução de ácido nítrico 1,5% durante 3 minutos, seguido por lavagem com água por 1 minuto. A impregnação foi realizada com agitação em solução de AgNO₃ 0,2% por 20 minutos, seguida de lavagem com água destilada. Para revelar o gel, foi utilizada solução com 30 g.L⁻¹ de Na₂CO₃ e 500 µL de formaldeído, com volume final de 2L. Sendo que 1L foi utilizado inicialmente até começar a aparecer os fragmentos, a solução é então descartada e o outro litro adicionado para finalizar o processo, que ocorre sob agitação das placas. Por fim, o gel foi colocado em solução bloqueio, com ácido acético 5%, por 8 minutos e lavado em água por 3 minutos.

Finalizada a revelação do gel, ele foi mantido em suporte em posição vertical em lugar seco e arejado. Após seco, foi realizada a genotipagem por meio de leitura visual dos fragmentos gerados pelos marcadores, com auxílio de fonte de luz branca, permitindo a genotipagem. Esta foi feita a partir de um sistema binário, indicando presença ou ausência de bandas em um determinado genótipo. Os géis foram avaliados visualmente e os seus dados foram transferidos para uma planilha do programa Excel para construção posterior de uma matriz. As marcas que apresentaram segregação 1:1, foram classificadas como “D1” (ao x oo), quando alelo se faz presente no genitor SP81-3250; “D2” (oo x ao), quando alelo está presente no genitor RB925345 e as que apresentaram segregação 3:1, classificadas como “C” (ao x ao), quando os dois genitores possuem presença do alelo (WU et al, 2002).

4.3. Avaliação da resistência ao carvão na população de mapeamento

4.3.1. Fonte do inóculo e inoculação do fungo *S. scitamineum*

Os teliósporos utilizados no preparo da suspensão para a inoculação foram coletados na Estação Experimental de Valparaíso da UFSCar localizado em Valparaíso – SP, região com alta incidência do carvão. Os teliósporos foram coletados em diferentes épocas do ano, de diferentes talhões, o que permite representar variabilidade genética do patógeno. Estes foram retirados das plantas e mantidos em embalagens, contendo 10 gramas, e armazenadas a 4°C.



Figura 5. Obtenção de esporos do *S. scitamineum*. a) plantas de cana-de-açúcar no campo apresentando o sintoma da doença, indicado por setas, na Estação Experimental de Valparaíso - SP, b) separação dos chicotes nas plantas com doença, c) chicotes, com teliósporos da doença.

A fim de realizar a inoculação, foi feito o teste de viabilidade dos esporos. Os esporos armazenados a 4°C foram então colocados em placas de petri com meio de cultura ágar-ágar para que ocorresse a germinação. Posteriormente, foi contada esta germinação em câmara de Neubauer, sendo que as placas que apresentaram germinação de teliósporos igual ou superior a 80% foram utilizadas para preparo de suspensões. As suspensões para inoculação foram feitas com água destilada e 10 gramas de teliósporos, a mistura foi realizada até a suspensão ficar pastosa (MORAIS, 2013). A inoculação ocorreu em dois períodos – manhã e tarde – até que toda a população e padrões fossem inoculados. Em cada período, de cada dia, foi feita uma nova suspensão a qual inoculava parte da população e todos os padrões utilizados no experimento. Sendo assim, o experimento I possui 6 repetições de padrões porque ocorreu o processo de inoculação em 6 períodos, manhã e tarde de 3 dias, e o experimento II possui 7 repetições ter sido necessário preparar a

suspensão de inoculação 7 vezes, 4 manhãs e 3 tardes de inoculação para ser inoculada toda a população.

Sendo assim, além da progênie F1 e os genitores, cada repetição continha variedades padrões que tem a reação ao fungo causador do carvão já conhecidas, sendo elas: Co-740 (suscetível), IAC66-6 (suscetível), NA56-79 (intermediária), CB49-260 (intermediária) e CB41-76 (resistente). Também foram incluídas em cada repetição dos experimentos as variedades RB925345, SP81-3250 e RB867515.

A inoculação artificial seguiu com a metodologia de injeção, a qual foi realizada com objeto feito de tubo de caneta e contendo duas agulhas, que foram imersas na suspensão pastosa. A aplicação ocorreu na base das gemas, em diagonal. Cerca de 100 toletes, contendo uma gema de cada genótipo, foram inoculados com a suspensão. Posterior à inoculação os toletes foram plantados em duas bandejas, com 50 toletes em cada e substrato organo-mineral "Plantmax", conforme Figura 6.

As inoculações foram realizadas e em seguida as bandejas com a serem avaliadas foram levadas à casa de vegetação, o mesmo ocorreu para os dois experimentos. Inicialmente, em casa de vegetação fechada com gás ligado para aquecer o ambiente, mantendo-o com uma temperatura de 28-31°C sendo esta temperatura considerada ótima para as plantas germinarem (BOLDRINI, 2016; BUENO, 2010; BHUIYAN et al., 2012; QUE et al., 2014) até que as plantas começassem a crescer. Esta etapa durou um mês e então as bandejas com os genótipos foram transferidas para casa de vegetação com controle apenas de umidade, ocorrendo a irrigação por aspersão durante 10 minutos, três vezes ao dia e a temperatura a ambiente.



Figura 6. Processo de inoculação do fungo *S. scitamineum* iniciado em a) recipiente contendo 10g de teliósporos armazenados em sílica, b) teliósporos colocados em béquer, c) mistura de teliósporos com água destilada, d) suspensão viscosa, e) suspensão de inoculação pronta e dividida em béqueres, f) inoculação na base da gema das plantas por injeção de teliósporos, g) plantação de toletes inoculados em bandejas, h) bandejas com substrato e mínimo de 50 toletes inoculados de cada genótipo plantados.

As avaliações da doença foram realizadas em dois períodos: Experimento I - novembro de 2013 até setembro de 2014, e Experimento II - maio de 2015 até fevereiro de 2016. O delineamento experimental foi de blocos casualizados com duas repetições, sendo que cada repetição foi constituída de uma bandeja contendo 50 gemas.

Assim que o material foi transportado para a casa de vegetação em que ocorreram as avaliações – com temperatura ambiente e irrigação de 10 minutos de duas a três vezes ao dia –, foi anotado o número de gemas germinadas por bandeja. A avaliação do carvão foi realizada através da contagem semanal do número de chicotes em cada genótipo considerando as duas repetições ao longo de 25 avaliações consecutivas (BHUIYAN et al., 2010; BOCK, 1964; BURNER; LEGENDRE, 1993; MAGAREY et al., 2005; MORAIS, 2013; RAGO et al., 2009). Após a contagem, as plantas contendo os chicotes foram imediatamente retiradas por inteiro e queimadas. A incidência de carvão foi anotada em relação aos dias após a primeira avaliação, sendo esta 0 e seguiu por 263 dias no primeiro experimento e 198 dias no segundo experimento. Os valores em dias foram convertidos para número de avaliação para melhor análise e que foram de 1 a 25 avaliações. O experimento I teve duração de 10 meses, e o experimento II, 9 meses,

ambos iniciaram as avaliações a partir do surgimento do primeiro chicote, o qual ocorreu dois meses após a inoculação do *S. scitamineum*, em ambos experimentos.

4.3.2. Avaliação da resistência

Para analisar a resposta de resistência ao carvão foram utilizados os dados da incidência de chicotes por genótipo da progênie F1 nas duas repetições, em casa de vegetação semanalmente. Foram totalizadas 25 avaliações. Com base nessas informações foi possível para observar o progresso da doença e também calcular a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD – *Area Under Disease Progression Curve*). Os cálculos de área foram realizados a cada avaliação, até chegar ao fim do ciclo de leituras, para os dois anos de experimentos, separadamente.

O cálculo da área abaixo da curva de progresso da doença foi realizado pelo programa estatístico R, utilizando a equação desenvolvida por Campbell e Madden (1990):

$$AACPD = \sum_i^{n-1} \left(\frac{y_i + y_{i+1}}{2} \right) * (t_{i+1} - t_i) \text{ (equação 1)}$$

Onde n é o número de avaliações no ciclo e y o valor de incidência da doença em um tempo t.

Com o cálculo de AACPD, os dados foram preditos pelo melhor preditor linear não viesado (*Best Linear Unbiased Prediction* - BLUPs) que foram utilizados para cálculo de parâmetros genéticos, como variações (genética e ambiental) e herdabilidade. Para isto, foi utilizado o programa para análises genéticas Genstat (PAYNE et al., 2009). A herdabilidade foi calculada para o sentido amplo de plantas individuais, seguindo as equações:

$$h^2 = \frac{V_G}{(V_G + V_E)}$$

$$h^2 = \frac{V_G}{(V_G + \frac{V_E}{2})} \text{ (equações 2 e 3)}$$

Onde h^2 é a herdabilidade no sentido amplo de plantas individuais, V_G é a variância genotípica e V_E é a variância ambiental (FALCONER; MACKAY, 1996), a equação 2 representa a herdabilidade no sentido amplo de plantas individuais e a equação 3, herdabilidade no sentido amplo de plantas individuais em média, sendo considerada as duas repetições do experimento.

4.4. Construção de mapa e mapeamento de QTL

Os dados coletados da genotipagem dos marcadores moleculares microssatélites foram utilizados a fim de construir o mapa genético. Aplicou-se o teste qui-quadrado ao nível de significância 5% e correção de Bonferroni para identificar segregação dos marcadores e analisar quais estão de fato ligados, por meio da análise de verossimilhança, para poder seguir com passo de construção de mapa, a segregação esperada era de marca única (1:1 ou 3:1). Após verificar a segregação dos marcadores e se estão ligados, determinou-se a ordem em que apareciam, em seus respectivos grupos de ligação e de hom(eo)logia. Análises e construção de mapa foram realizadas pelo programa estatístico R, utilizando pacote *OneMap* desenvolvido para construção de mapa integrado com cana-de-açúcar, considerando um LOD score de 5 e fração de recombinação de 0,32 (MARGARIDO et al., 2007; MORAIS, 2013; MANCINI, 2014; GARCIA et al., 2006). O mapa de ligação foi desenhado pelo programa *MapChart* (VOORRIPS, 2002).

Para procurar associação entre genótipo e fenótipo, os marcadores moleculares SSR e dados fenotípicos de avaliação do carvão (AACPD), foi utilizado o programa R. A busca por associação foi realizada utilizando a abordagem de marca simples (SM), a mais simples e que não utiliza o mapa de ligação para a detecção de associação (DOERGE, 2002; EDWARDS et al., 1987; LYNCH; WALSH, 1998). Esta é abordagem mais adequada para este estudo pelo fato de estarmos trabalhando com mapa de ligação com poucas marcas associadas.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Genotipagem da população, análise da segregação dos locos e construção do mapa de ligação

Os dados obtidos na genotipagem da progênie F_1 na análise de segregação dos marcadores microssatélites e na construção do mapa estão expostos na Tabela 1.

Foi genotipada uma progênie de 238 indivíduos e genitores com um total de 99 marcadores microssatélites (SSR), sendo 82 EST-SSR e 17 SSRg perfazendo uma média total de aproximadamente 4 alelos por loco.

Foram geradas 450 marcas, sendo 374 polimórficas (83% de marcas polimórficas). De um total de 374 marcas polimórficas obtidas na população de mapeamento (241 indivíduos), 45% (168 marcas) foram classificadas como “D1” ou “D2” e 23% (88 marcas) apresentaram segregação 3:1. As 118 marcas (32%) não apresentavam este tipo de segregação esperada. Foi feita a análise de segregação com cálculo de qui-quadrado corrigida pelo método de Bonferroni em todas as 374 marcas SSR, e foram descartadas 118 marcas que não segregavam como o esperado (dose única, 3:1 ou 1:1) (Tabela 1).

Tabela 1. Segregação das marcas obtidas para a população do cruzamento entre as variedades de cana-de-açúcar SP81-3250 e RB925345

	Fragmentos
Número de marcas amplificadas	450
Número de marcas polimórficas	374
^a Dose-única (1:1)	168
^b Dose-única (3:1)	88
Número total (1:1 e 3:1)	256
Número de marcas com distorção	118
Número de marcas não ligadas	128

^a Marcas presentes em apenas um dos genitores, com segregação 1:1 na população de mapeamento

^b Marcas presentes nos dois genitores, com segregação 3:1 na população de mapeamento

Para a construção do mapa de ligação, separando-os em grupos de ligação, foi utilizado valor LOD de 5 e fração de recombinação de 0,32. Valores bem próximos a este LOD e fração de recombinação foram utilizados em outros trabalhos para construção do mapa de ligação como os usados por Aitken et al (2005), Garcia et al (2006), Mancini (2014), Morais (2013), Oliveira (2007), Raboin et al (2006) também na construção de mapa para cana-de-açúcar. Com isso, do total de 256 marcas que apresentaram segregação esperada de dose única (1:1 ou 3:1), apenas 128 foram utilizadas na construção do mapa. Foram gerados 49 grupos de ligação (GL), sendo que 30 deles possuíam duas marcas, 13 possuíam três marcas, 4 GLs possuíam 4 marcas, 1 GL com cinco marcas e 1 GL com oito. Nos grupos que continham de 2 a

5 marcas, foi utilizado o comando *compare* para ordenação, enquanto o grupo com 8 marcas foi ordenado utilizando o comando *order*. O mapa de ligação foi construído utilizando o programa estatístico R, com auxílio do pacote *OneMap* (OLIVEIRA et al, 2007).

O mapa de ligação construído foi constituído por 49 grupos de ligação (Figura 1). O mapa possui comprimento total de 1297,68 cM, com distância média de marcadores adjacentes de 26,5 cM. O menor de grupo de ligação foi o GL 49 com 3,87 cM de comprimento, ao passo que o GL 1 foi o maior grupo de ligação com 147,15 cM. Das 11 novas marcas desenvolvidas neste trabalho, 4 foram alocadas para a construção do mapa de ligação e foram incluídas em três grupos de ligação, sendo que duas marcas permaneceram no GL 1, uma originada pelo genitor RB925345 e uma por ambos os genitores; uma marca no GL 3 com origem no genitor SP81-3250 e uma marca no GL 12 oriunda de ambos os genitores. Metade das marcas que tinham a segregação esperada MDU, não foi utilizada para a construção deste mapa genético. Isto ocorreu pelo fato de que houve grande número de dados perdidos. Na literatura há outros trabalhos que também fizeram construção de mapa de ligação integrado de cana-de-açúcar utilizando marcadores SSR. Garcia et al. (2006) utilizaram a progênie de um cruzamento entre duas variedades comerciais e construíram mapa de ligação com uso do programa denominado *OneMap*. Para a construção de mapa de ligação foram utilizadas 1118 marcas simples geradas por marcadores moleculares RFLP, SSR e AFLP. O mapa final foi montado com 357 (32%) marcas ligadas, sendo elas 57 RFLPs, 64 SSRs e 236 AFLPs.

No trabalho desenvolvido por Oliveira et al. (2007), foi utilizada uma população oriunda de um cruzamento entre variedades comerciais para construção de mapa de ligação. Foram utilizados 149 marcadores EST-SSR e 10 EST-RFLP, os quais geraram 2303 marcas polimórficas, em que 1669 eram marcas simples das quais 664 (40%) se ligaram para construção do mapa. Palhares et al. (2012) utilizaram 685 marcas AFLP, 220 marcas EST-SSR e 87 marcas *sclvana_1* as quais 535 AFLP, 130 EST-SSR e 65 *sclvana_1* eram marcas de dose simples, com um total de 730 marcas MDU. Destas, 546 (75%) ligaram para a construção do mapa de ligação, sendo 395 AFLPs (74%), 95 EST-SSR (73%) e 56 *sclvana_1* (86%).

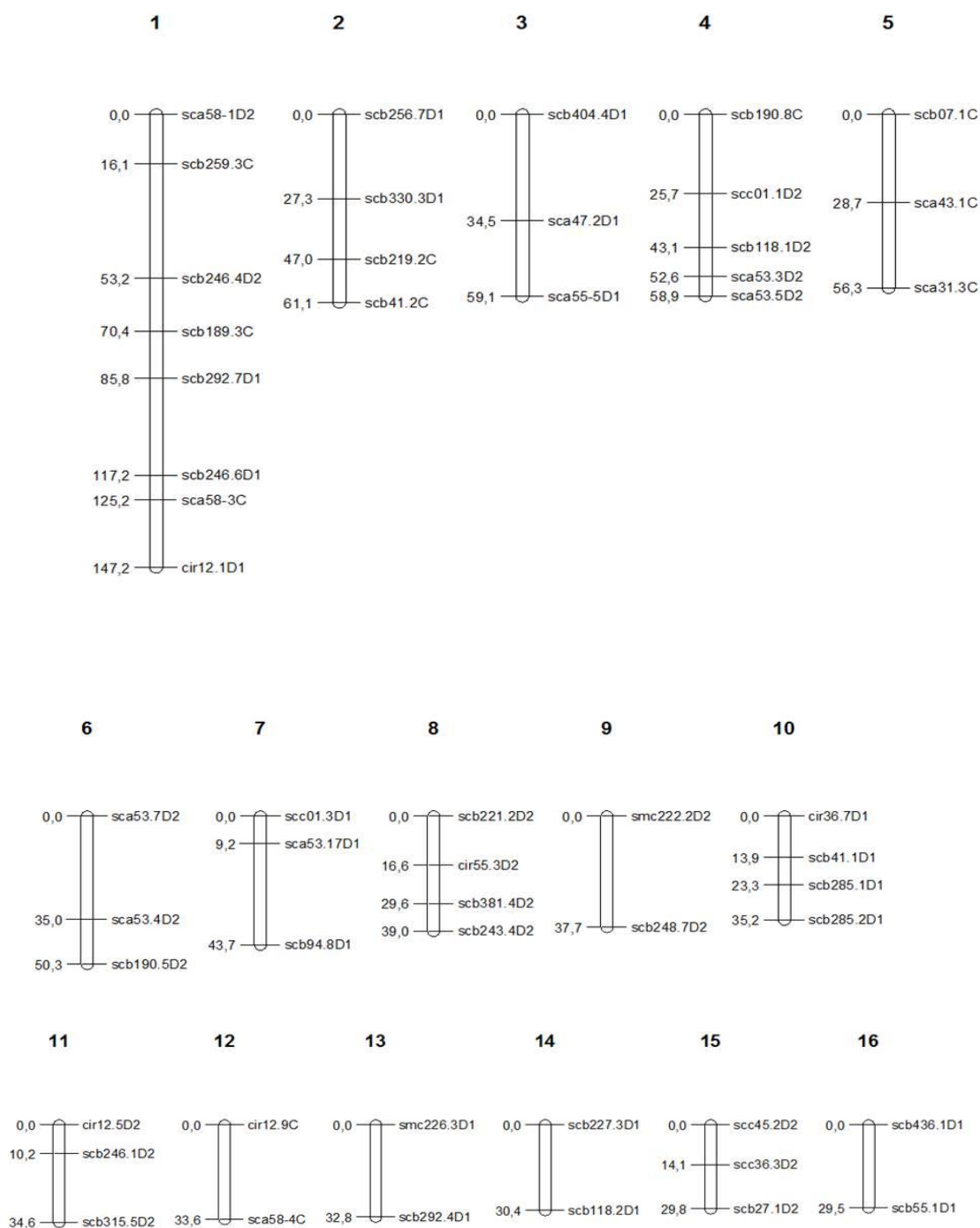


Figura 7. Mapa de ligação integrado de cana-de-açúcar com base na progênie do cruzamento de SP81-3250 e RB925345. À direita estão os nomes dos marcadores com as siglas D1, para marca de origem do genitor SP81-3250, D2 para marca de origem do genitor RB925345 ou C para marca de origem em ambos os genitores. À esquerda, os números correspondem às distâncias em que as marcas se encontram no mapa, em cM.

(continua)

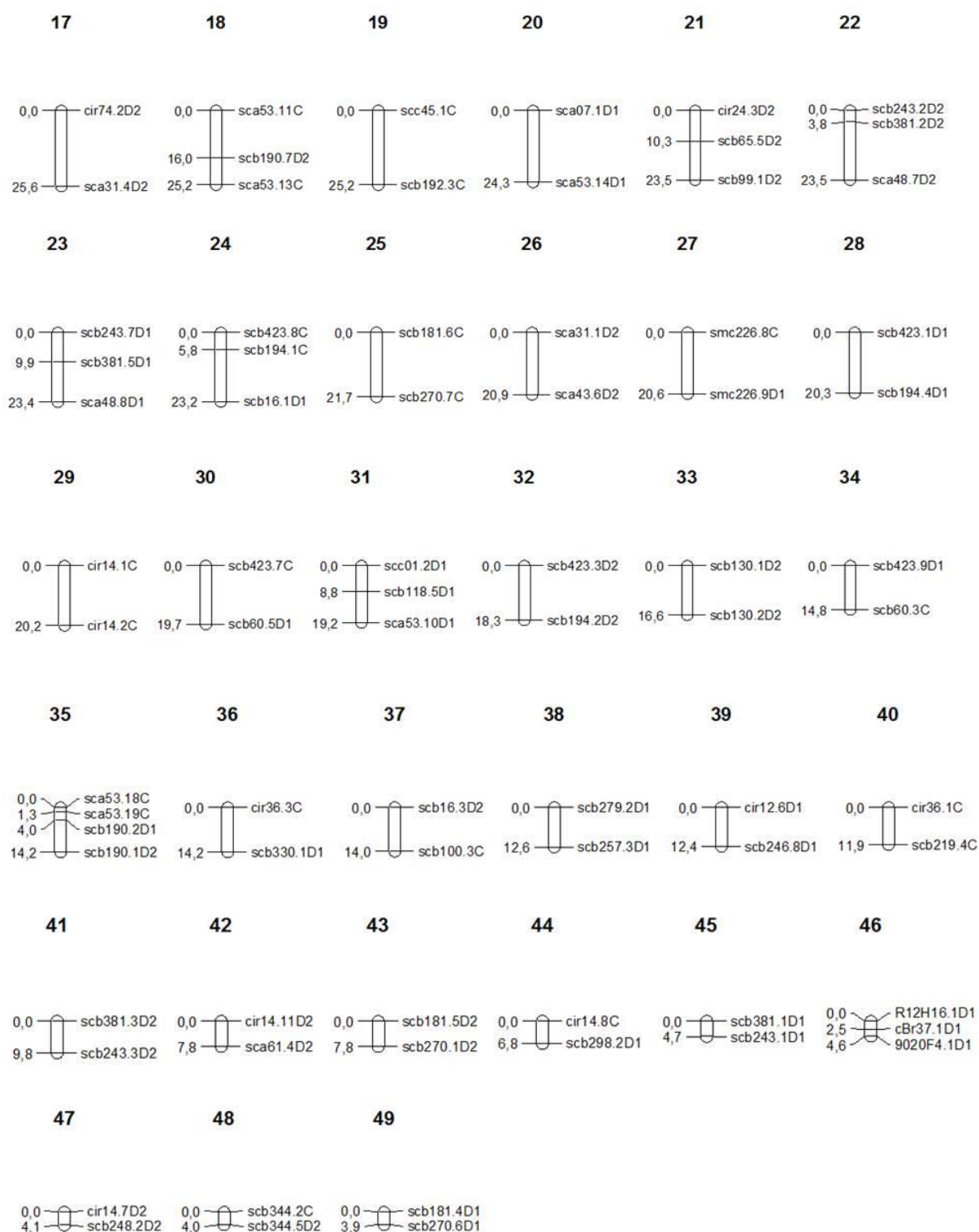


Figura 7. Mapa de ligação integrado de cana-de-açúcar com base na progênie do cruzamento de SP81-3250 e RB925345. À direita estão os nomes dos marcadores com as siglas D1, para marca de origem do genitor SP81-3250, D2 para marca de origem do genitor RB925345 ou C para marca de origem em ambos os genitores. À esquerda, os números correspondem às distâncias em que as marcas se encontram no mapa, em cM.

(conclusão)

Pastina et al. (2012) utilizaram também como população de cruzamento uma progênie oriunda do cruzamento entre duas variedades pré-comerciais para construção de mapa de ligação e busca de QTL. Foram usadas 741 marcas moleculares, sendo elas 188 RFLPs, 37 EST-RFLPs e 516 EST-SSR. Destas, 317 marcas (42,8%) foram mapeadas. Aitken et al. (2005) utilizaram como população de mapeamento a progênie de duas variedades da Austrália e 1075 marcas (AFLP, RAF e SSR). Mancini (2014) mapeou a mesma população deste trabalho com marcadores 254 EST-SSR e 31 SNPs, totalizando 285 marcas moleculares, das quais 163 (57%) foram ligadas.

O mapa de ligação desenvolvido por Mancini (2014) com a mesma população de mapeamento e com grande parte das marcas que foram utilizadas neste trabalho – com a inclusão de SNPs –, também apresentou uma baixa cobertura do genoma da cana. Como resultado, foram construídos 50 grupos de ligação, com um total de 163 marcas ligadas, com cobertura de 2147,6 cM. Mesmo com a definição de grupos de ligação próximos, o mapa desenvolvido neste estudo, utilizando a mesma população, as mesmas marcas SSR (com 2 marcadores adicionais) apresentou menor cobertura do genoma da cana-de-açúcar do que o mapa de ligação desenvolvido por Mancini (2014). Possivelmente isto foi observado pela diferença de critérios abordados na escolha da construção do mapa, como valores de LOD e fração de recombinação, que foram valores maiores do que neste estudo. Com isso verifica-se a necessidade de maior saturação do mapa, que é possível aumentando o número de marcadores moleculares utilizados na construção do mapa e com aumento também da diversidade de tipos de marcadores.

Pode-se dizer que o mapa desenvolvido neste trabalho não revelou maiores informações sobre o genoma da cana-de-açúcar e assim se apresenta ao verificar os mapas desta cultura presentes na literatura (AITKEN et al., 2005; GARCIA et al., 2006; MORAIS, 2013; OLIVEIRA et al., 2007; PALHARES et al., 2012; PASTINA et al., 2012; RABOIN et al., 2006). Porém, ainda assim, foi possível associar um marcador SSR aos dados de avaliação da resistência em um dos experimentos, na avaliação realizada no verão, período climático que favorece a doença. Esta associação pôde ser vista quando a metodologia de marcas simples (SM) foi utilizada para a de busca por associações e esta metodologia não faz uso de um mapa prévio de ligação.

5.2. Análise fenotípica

Os 238 genótipos da progênie F_1 foram avaliados para a incidência de carvão nos dois experimentos, juntamente com os genitores e variedades padrões. Na figura 8 está representada a reação ao fungo *S. scitamineum* em seis diferentes genótipos da progênie F_1 de cana-de-açúcar (MS07-710, MS07-664, MS07-938, MS07-949, MS07-681 e MS07-815) escolhidos aleatoriamente. Pode se observar que a doença se manifestou em diferentes momentos, representados em dias. Foi possível observar ainda o comportamento de genótipos resistentes (MS07-710 e MS07-664) e genótipos suscetíveis (MS07-938, MS07-949, MS07-681 e MS07-815).

Sendo assim, esta incidência representada em duas repetições e dois experimentos indica que, dos indivíduos exemplificados, MS07-710 e MS07-664 não apresentaram a doença em nenhuma das repetições dos dois experimentos, ou seja, não apareceu carvão em nenhum momento do experimento. Para os genótipos MS07-938 e MS07-949, o carvão se manifestou nas duas repetições, mas apenas em um ano do experimento, no experimento I e experimento II, respectivamente. Nunca nos dois experimentos simultaneamente. Já para os genótipos MS07-681 e MS07-815 a doença ocorreu em todas as repetições, dos dois experimentos.

A incidência foi dada pelo valor cumulativo em que ocorreu a doença no decorrer dos dias, conforme sugerido pela fórmula do cálculo de AACPD e utilizado também em outros estudos (BERGAMIN, 1995; CAMPBELL; MADDEN, 1990; MORAIS, 2013; RAGO et al., 2009). Utilizando como exemplo o genótipo MS07-681, foi possível observar que os primeiros sinais da doença começaram a surgir no experimento I com 20 dias após o surgimento do primeiro chicote (após os dois meses em que não havia sintoma da doença), nas duas repetições. Enquanto no experimento II, apenas após 100 dias de avaliação houve o surgimento do primeiro chicote. Enquanto no experimento I a incidência aumentava com o tempo, o experimento II apresentou a doença tardiamente ao atingir a condição ideal de temperatura para o desenvolvimento do patógeno, ao passar pelo verão.

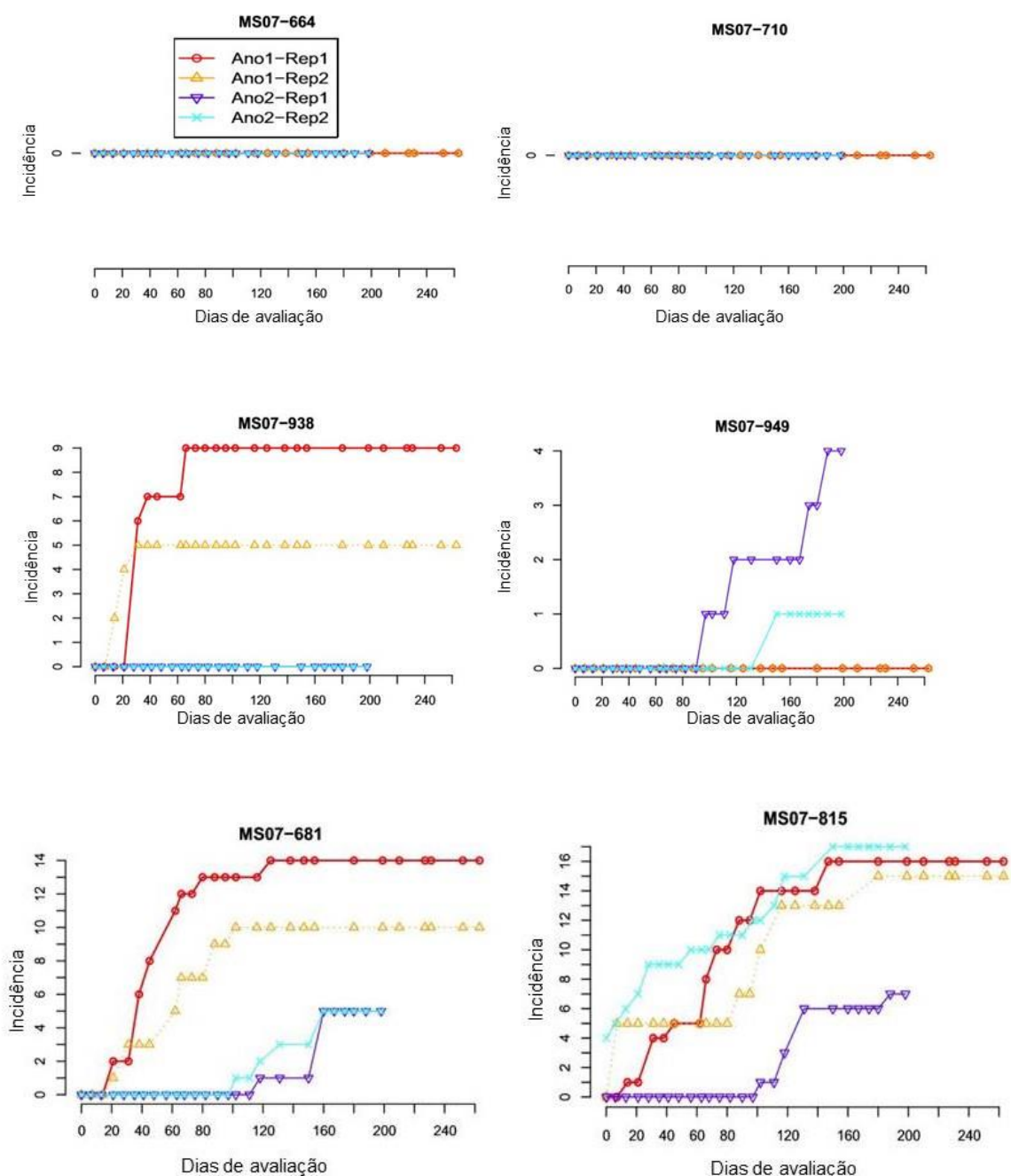


Figura 8. Incidência de *S. scitamineum* em genótipos da progênie F₁ obtida com o cruzamento entre SP81-3250 e RB925345 em casa de vegetação (experimento I: 253 dias e experimento II: 198 dias). As cores indicam as repetições: em vermelho está representada a primeira repetição do experimento I, laranja, segunda repetição para experimento I; roxo primeira repetição no experimento II e verde, segunda repetição no experimento II.

Ao observar a incidência da doença nos padrões e genitores (Figura 9), nos dois experimentos, foi possível notar que o experimento I apresentou maior incidência da doença assim que surgiu o primeiro chicote, dois meses após a inoculação e exatos 64 dias após a inoculação. Estudo realizado por Carvalho et al. (2016), apresenta

resultado próximo a este, em que o primeiro chicote foi observado com 76 dias após a inoculação do carvão por injeção de teliósporos. No experimento I deste trabalho, os picos de incidência da doença foram atingidos nos primeiros dias de avaliação, ocorrendo uma estabilização desta incidência com 60 a 140 dias de experimento, após a primeira avaliação. Este processo ocorreu para todos os padrões utilizados, independente de suas respostas já conhecidas à doença (intermediária ou suscetível).

No experimento II, conforme foi observado em todos os padrões utilizados, não ocorreram valores elevados da doença nos primeiros dias, após o surgimento do primeiro chicote na população de estudo. Sendo que esta incidência cresce, em todos os padrões avaliados, a partir de 100 dias de avaliação. O mesmo foi observado em toda a população em estudo, independente da resposta ao *S. scitamineum* das variedades (intermediária ou suscetível). Foi possível observar então, a partir dos padrões utilizados que o experimento I apresentou maior incidência do que o experimento II, o mesmo ocorreu com a progênie F₁ em estudo. Ainda sobre a incidência, notou-se que o genitor SP81-3250, utilizado como o resistente neste trabalho apresentou doença no experimento II, sendo possível dizer que neste genitor possui alelos de suscetibilidade à doença.

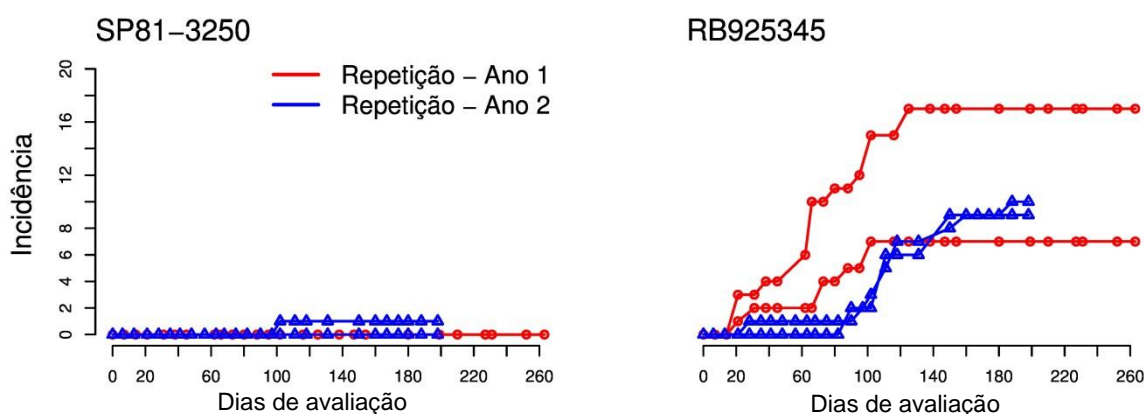


Figura 9. Incidência de *S. scitamineum* nos genitores, SP81-3250 e RB925345, e 6 variedades padrões em casa de vegetação, ao longo de 253 dias para o experimento I e 198 dias para o experimento II. Em vermelho está representado o experimento I com 6 repetições de padrões, e em azul o experimento II com 7 repetições de padrões, conforme o número de preparo de suspensão para inóculo em cada experimento.

(continua)

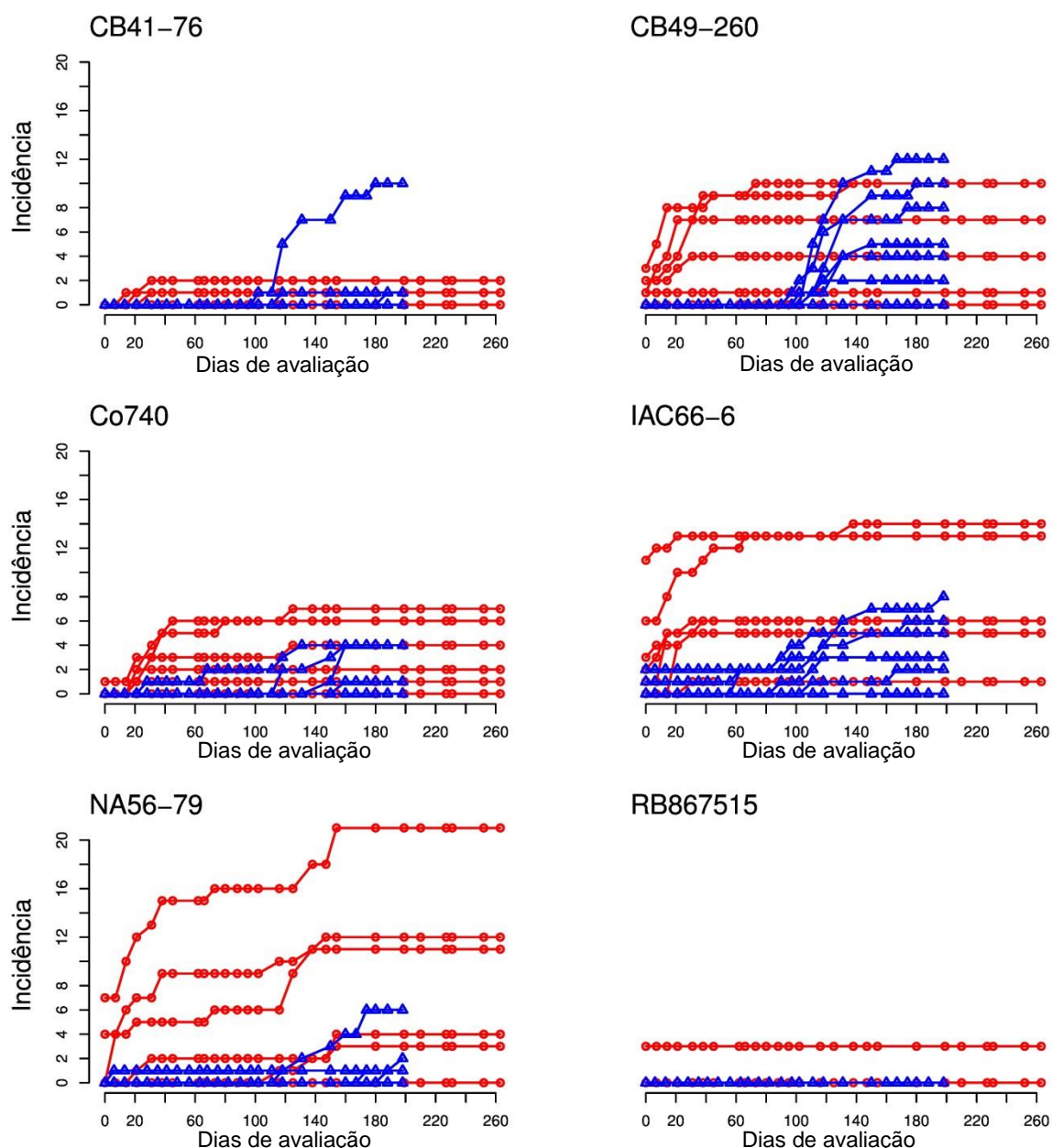


Figura 9. Incidência de *S. scitamineum* nos genitores, SP81-3250 e RB925345, e 6 variedades padrões em casa de vegetação, ao longo de 253 dias para o experimento I e 198 dias para o experimento II. Em vermelho está representado o experimento I com 6 repetições de padrões, e em azul o experimento II com 7 repetições de padrões, conforme o número de preparo de suspensão para inóculo em cada experimento.

(conclusão)

A diferença de resultados da incidência da doença em cada um dos dois experimentos em casa de vegetação pode ser justificada pelo fato de eles ocorrerem em diferentes condições de temperatura durante as suas realizações. Foi possível observar melhores resultados, ou seja, maior incidência da doença no experimento montado em Novembro/2013 e o qual iniciaram as avaliações com surgimento do primeiro chicote em Janeiro/2014. Por ser verão, é a época em que a doença possui

melhores condições climáticas para seu desenvolvimento, pois clima quente e úmido é o ideal para a germinação e desenvolvimento do *S. scitamineum*, como demonstrado por RABOIN et al. (2003). Já o experimento II foi montado após o verão, no outono e suas avaliações tiveram início no final do inverno. Neste clima as condições não são favoráveis para o desenvolvimento da doença, havendo um decréscimo e/ou o seu não surgimento, mesmo nas variedades suscetíveis. As baixas temperaturas registradas no início do experimento II somadas à alta umidade – por esta ser fixa e controlada – podem resultar na germinação dos esporos que, entretanto não conseguem se desenvolver para a sua próxima estrutura, a qual possui temperatura ótima para desenvolvimento de 31°C (BERGAMIN et al., 1995; BOCK, 1964; BHUIYAN et al., 2012). O mesmo ocorreu em estudo realizado por LUBBERSTEDT et al. (1999), ao realizar experimento com o carvão em milho. As avaliações ocorreram em quatro anos consecutivos, em campo e, em três deles, o nível de infecção foi similar. Porém, em um dos anos houve uma temperatura menor e com maior precipitação em comparação aos outros anos e, justamente neste, a incidência da doença foi muito baixa.

A Figura 10 apresenta a relação entre temperatura e incidência do *S. scitamineum* durante todo o experimento, desde o dia de inoculação até a 25ª avaliação. Foi observado que em temperaturas mais elevadas atingidas no experimento – em torno de 27°C e 28°C – a incidência da doença na população de estudo foi maior. Sendo assim, o experimento I, que apresentou maior incidência em relação ao experimento II, valores maiores de ocorrência da doença, foram encontrados com temperaturas em torno de 27,2°C. À medida que a temperatura decresceu, diminuiu também a incidência da doença.

No experimento II, na décima avaliação a temperatura começa a subir e o experimento atinge um de seus picos máximos, com 27,55°C. Em seguida, na décima terceira avaliação, o que corresponde a 90 dias após o surgimento do primeiro chicote, a incidência começou a aumentar, sendo esse crescimento da incidência com 100 dias, como observado na figura 9. O segundo auge de máxima média ocorrida no experimento II é observado na avaliação 21, com 28,15°C. Sendo que no segundo experimento o máximo de incidência ocorre na décima sétima avaliação.

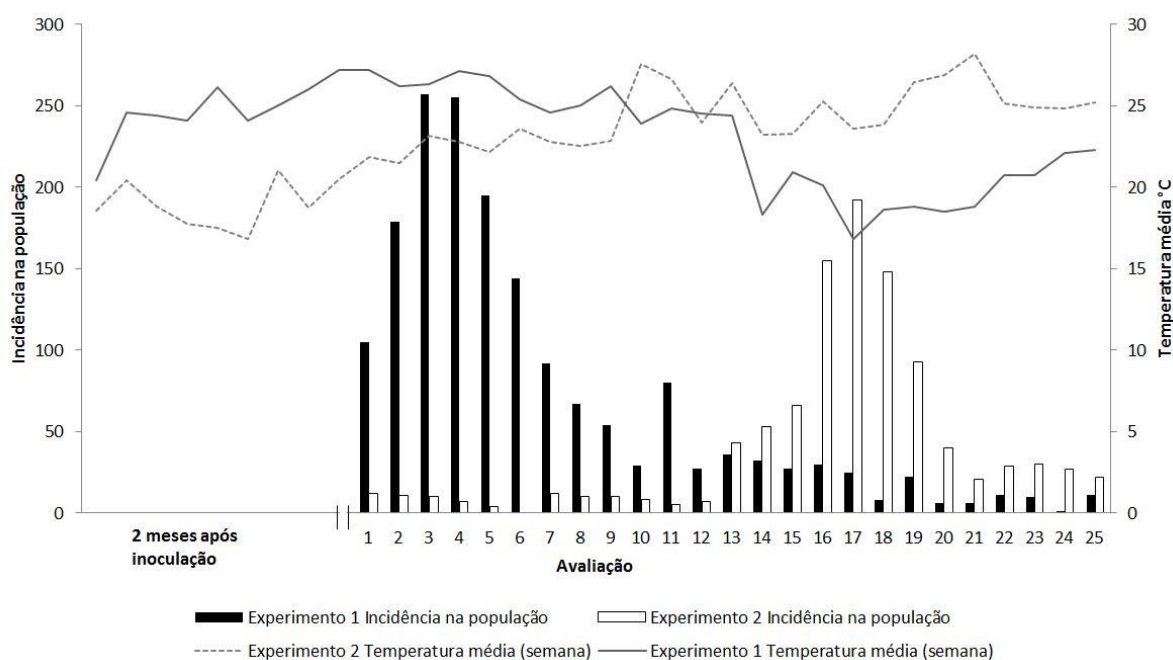


Figura 10. Registro da temperatura média semanal a partir do período de inoculação dos toletes de cana-de-açúcar com o fungo *S. scitamineum* até as avaliações de incidência da doença. O período das avaliações da doença começam em 0 e foi até 25.

Ao observar ainda, a figura 10, é possível constatar que o experimento I obteve desde o momento da inoculação, temperaturas mais propícias para o desenvolvimento do fungo. Inicialmente, teve o início com temperaturas de 21°C, aumentando para 26°C, com 3 semanas antes do surgimento do primeiro chicote e obtendo seu máximo na semana avaliação 0 e 1, com 27,1°C. Isto condiz com a literatura pelo fato de ser descrito que a temperatura ótima para a germinação e desenvolvimento do *S. scitamineum* é em média de 25°C (BUENO, 2010; BHUIYAN et al., 2012). Os picos de incidência, no experimento I se mostraram nas avaliações 3 e 4, após 3 semanas das temperaturas mais elevadas.

Ainda na figura 10, o experimento II, as temperaturas após o momento de inoculação foram muito baixas, sendo essas menores que 20°C. Passando a 23°C na avaliação 3 e desde então atingindo maiores temperaturas. A máxima atingida no experimento II é de 28°C na avaliação 21 e o pico de incidência ocorrido neste experimento é na avaliação 18, após 8 semanas o experimento atingir a segunda maior temperatura, de 27°C. Ainda assim, a incidência começa a aumentar a partir desta temperatura, como dito anteriormente para o experimento, foram as temperaturas mais altas alcançadas e que propiciaram o desenvolvimento do fungo e surgimento do sintoma/sinal do carvão.

O cálculo da AACPD para cada indivíduo foi realizado a partir da área que se formou abaixo da curva de progresso da doença. Outros trabalhos que estudam a doença do carvão em cana-de-açúcar também utilizam o cálculo da área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) para análise de resistência da planta à doença (MORAIS, 2013; RAGO et al., 2009).

Como observado nas figuras 8 e 9, essas áreas foram formadas com base na incidência da doença em relação ao tempo. Sendo assim, quando ocorre a doença, a área formada aumentou independente do surgimento de novos chicotes, mas devido ao aumento do tempo de experimento. Quanto mais rápida a doença se manifesta, maior é a área calculada. O resultado destas áreas está representado nas Figuras 11 e 13, para o experimento I e II, respectivamente.

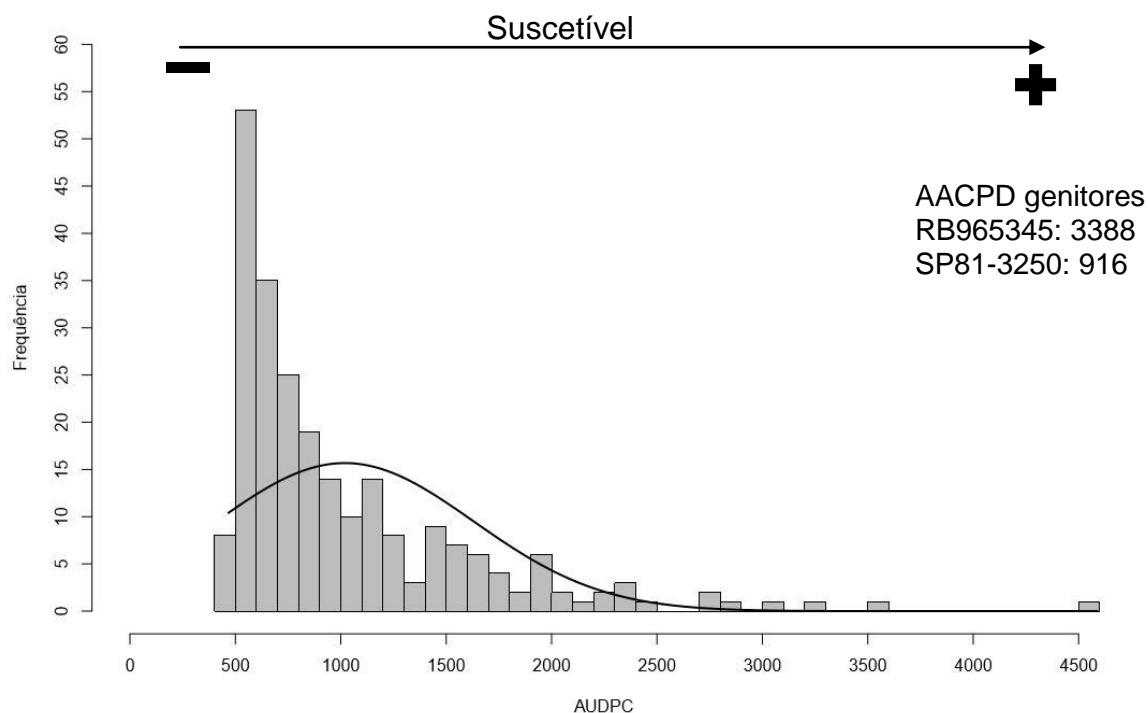


Figura 11. Distribuição dos valores de AACPD (BLUPs) na progênie F_1 oriunda do cruzamento entre os genitores SP81-3250 e RB925345, representada a frequência de genótipos com os valores da área calculada. Indicação da curva de tendência dos valores de AACPD (BLUPs) e do nível de suscetibilidade em relação á área. Como legenda, à direita estão os valores da área calculados para os genitores, no experimento I.

Em relação aos resultados gerados da doença em cada genótipo no experimento I, foi possível observar uma maior frequência de indivíduos com baixa incidência da doença (cerca de 80% de indivíduos com AACPD abaixo de 1500). Assim, a progênie F_1 em estudo apresentou maior número de genótipos com baixo valor de

AACPD, sendo estes resistentes (AACPD em torno de 500) e pouco suscetíveis (AACPD 1000) ao carvão. A frequência de genótipos com valores altos de área calculada é baixa, havendo nesta população poucos genótipos com alta suscetibilidade e com grande incidência (Figura 11). Foi possível observar também para este experimento os menores valores de AACPD foram similares à variedade SP81-3250, utilizada como genitor resistente à doença, visto que nos dados de contagem do número de chicotes os valores obtidos para este genitor foram iguais à zero (sem chicotes ao longo das avaliações) (Figura 9). Porém, no histograma (Figura 11) o mesmo não apresentou valor zero. Isso aconteceu porque para o cálculo da área da curva do progresso da doença foram utilizados os valores de BLUPs, que consideram valores não apenas o efeito do fenótipo, mas também com outras variáveis que podem interferir no experimento.

Também no histograma da Figura 11, foi observado que ocorreram genótipos com valores de área calculada maiores do que do próprio genitor suscetível utilizado no cruzamento bi-parental para gerar a população, o RB925345.

A AACPD calculada e corrigida para valores de BLUPs foram utilizadas para calcular as correlações de todas as 25 avaliações no decorrer dos experimentos. Estas correlações são visíveis pelos *heatmaps* gerados pelo programa estatístico R (Figuras 12 e 14).

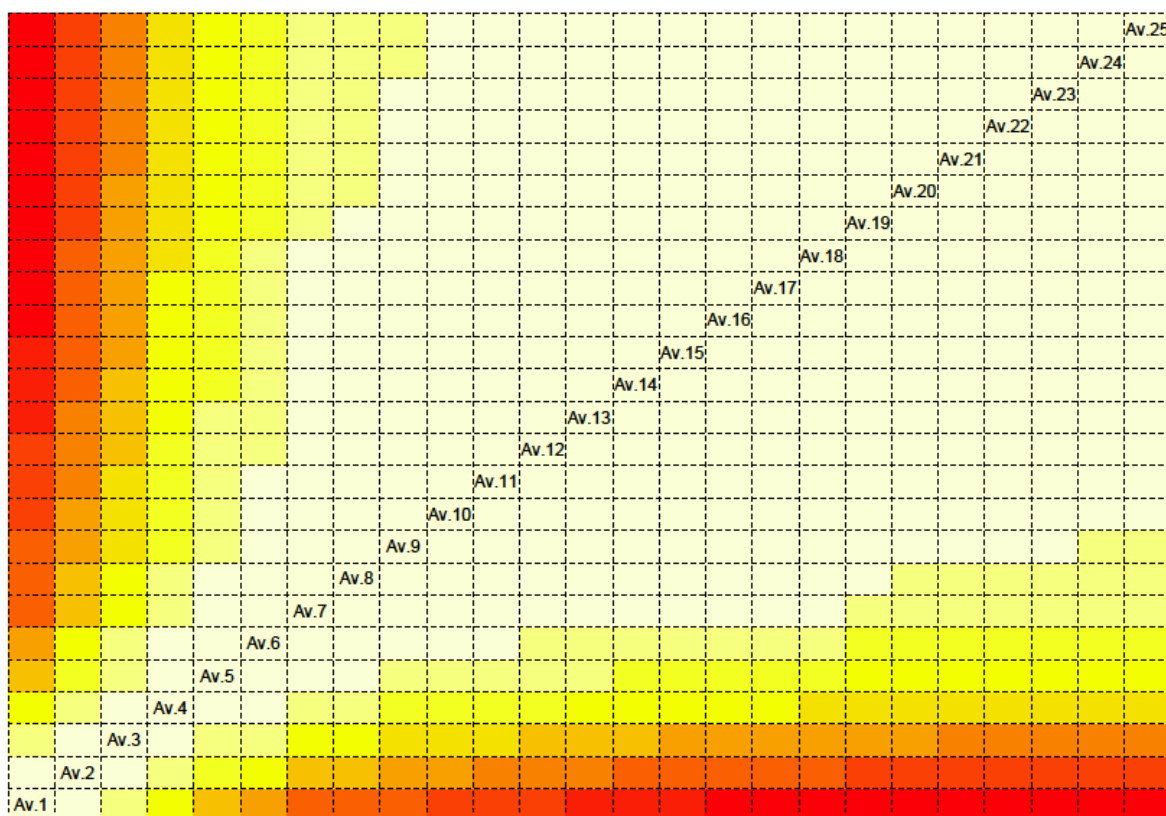


Figura 12. Representação gráfica da correlação entre as avaliações de carvão em cana-de-açúcar. As 25 avaliações estão representadas na diagonal com o número das respectivas realizadas ao longo de 253 dias. As cores mais quentes representam maior distância entre as correlações. Em bege estão valores de 1-0,97; amarelo claro 0,96-0,93; amarelo 0,92-0,86; laranja claro 0,85-0,82; laranja 0,81-0,69 e vermelho 0,68-0,58.

As correlações entre as 25 avaliações para o experimento I, foram altas ao considerar correlações consecutivas, ou seja, não houve diferença significativa nos resultados de uma avaliação para a outra, pois estavam altamente correlacionados. No decorrer das avaliações, ao comparar a correlação de uma avaliação inicial com uma mais distante, estas vão se distanciando significativamente. Esta diferença é observada pelo aumento progressivo da AACPD, com o surgimento de novos chicotes com o passar do tempo. A partir da décima avaliação, as correlações entre as demais avaliações são muito semelhantes (Av.10 à Av. 25) até chegar à avaliação final. Sendo estas correlações muito altas, em de 97% da Av. 10 com a 25 e a partir da Av.13. com 100% de correlação até a Av.25. Isto significa que o experimento poderia ter sido finalizado anterior à vigésima quinta avaliação, pois os demais dados gerados foram semelhantes aos da décima semana.

Os parâmetros genéticos, obtidos pelos valores de AACPD (BLUPs) estão representados nas Tabelas 2 e 3, com os resultados dos experimentos I e II,

respectivamente. O valor de herdabilidade no primeiro experimento é moderado tanto na herdabilidade no sentido amplo de plantas individuais sozinhos quanto em médias ao considerar as duas repetições. Sendo que o valor de h^2 final é de 0,57. Como as demais variáveis, a herdabilidade foi calculada para cada uma das 25 avaliações, sendo possível observar grande amplitude entre a primeira e última. Porém, os valores de h^2 , variam da primeira à quarta avaliação em 0,15, da quarta à sétima em 0,10 e da sétima à vigésima quinta em apenas 0,05, indicando que os resultados se mantiveram constantes desde a sétima avaliação.

A herdabilidade média foi de 0,22 da primeira à quarta avaliação, passando a 0,06 da quarta à sétima e de 0,06 da sétima à vigésima quinta avaliação. O valor de herdabilidade ao ser considerado no fim do experimento, após as 25 avaliações, segue como da literatura (CHAO, 1990; MORAIS, 2013; RABOIN et al., 2003; WU et al., 1988) no experimento I, demonstrando uma herdabilidade moderada para a doença.

No experimento II a frequência de genótipos com os valores de AACPD (BLUPs), apresentou amplitude dos valores calculados para a área foi baixa, variando de 200 a 380, resultado da baixa incidência da doença neste experimento (Figura 13). O mesmo ocorreu ao observar os padrões e genitores utilizados neste experimento (Figura 9). Além do exposto, foi possível ser notado que o genitor utilizado como resistente neste trabalho apresentou doença em um momento do experimento II. Logo, este genitor não é 100% resistente.

Tabela 2. Estimativa da variância genética, variância ambiental, influência da repetição, padrões e germinação e do coeficiente de herdabilidade no sentido amplo individual e em média na progênie F_1 observada ao longo de 25 avaliações para incidência do carvão no experimento I.

Avaliação	Variância genética	Variância ambiental	Repetição p-valor	Padrões p-valor	Germinação p-valor	h^2	$h^2_{\text{média}}$	Média
1	11,1	104,5	0,767	<0,001	0,01	0,10	0,18	7,61
2	92,9	516,4	0,405	<0,001	0,01	1,15	0,26	17,09
3	346	1480	0,08	<0,001	0,00	0,19	0,32	30,29
4	1403	4209	0,008	<0,001	0,00	0,25	0,40	54,59
5	2940	7316	0,002	<0,001	0,00	0,29	0,45	73,90
6	5280	11622	<0,001	<0,001	0,00	0,31	0,48	94,41
7	14598	27536	<0,001	0,002	0,01	0,35	0,51	145,91
8	17588	32477	<0,001	0,003	0,01	0,35	0,52	158,84
9	235556	42382	<0,001	0,005	0,01	0,36	0,53	183,09
10	30450	53880	<0,001	0,006	0,01	0,36	0,53	208,26
11	39749	68924	<0,001	0,009	0,01	0,37	0,54	237,64
12	49165	83881	<0,001	0,011	0,02	0,37	0,54	263,81
13	59729	100613	<0,001	0,014	0,02	0,37	0,54	291,30
14	84544	139356	<0,001	0,018	0,02	0,38	0,55	348,74
15	103057	167951	<0,001	0,019	0,03	0,38	0,55	386,82
16	133312	214524	<0,001	0,019	0,03	0,38	0,55	444,18
17	156764	250582	<0,001	0,019	0,04	0,38	0,56	484,64
18	176434	280851	<0,001	0,018	0,04	0,39	0,56	516,56
19	261196	408604	<0,001	0,016	0,05	0,39	0,56	636,51
20	334912	517148	<0,001	0,014	0,06	0,39	0,56	724,17
21	381952	586042	<0,001	0,013	0,07	0,39	0,57	774,93
22	461086	701288	<0,001	0,013	0,07	0,40	0,57	853,39
23	480851	729978	<0,001	0,012	0,07	0,40	0,57	871,86
24	591674	890394	<0,001	0,011	0,08	0,40	0,57	968,80
25	654578	980830	<0,001	0,011	0,08	0,40	0,57	1019,57

É possível verificar que o menor valor de AACPD é em torno de 300 para o primeiro experimento e 200 para o segundo, aonde se encontram os genótipos mais resistentes, que em dados brutos de incidência equivalem a 0. O maior valor da área calculada é de 4400, um valor acima do equivalente ao genitor suscetível, que apresentou valor igual a 1700 no experimento I e o experimento II apresenta maior valor com 380. Os dados tiveram amplitude de 4100 quanto ao cálculo da área no experimento I, entre extremos de resistência e suscetibilidade, de mostrando que embora exista essa amplitude, os genótipos da população em estudo se concentram

em valores de áreas menores, ou seja, apresentam-se como sendo uma população com grande número de genótipos mais resistentes e tolerantes do que suscetíveis.

No experimento II esta amplitude foi muito baixa, sendo de 180, o que não diz muito sobre a doença. Isto pode ser justificado pelo fato de o segundo experimento ter sido realizado em momento de temperaturas mais baixas, as quais não favoreceram para que ocorresse a doença (BOCK, 1964; CHANDIPOSHA, 2013; LUBBERSTEDT et al., 1999; RABOIN et al., 2003; ZHAO, 2015).

O genitor suscetível RB925345 apresentou resultados menores do que grande parte de genótipos da população em estudo, no experimento I, o que indica que o genitor escolhido como resistente, embora neste ano de avaliação não apresente nenhum chicote durante o experimento em casa de vegetação, pode ter genes de suscetibilidade à doença. Já no experimento II, como dito anteriormente, o genitor considerado resistente, SP81-3250 apresentou uma baixa incidência de doença.

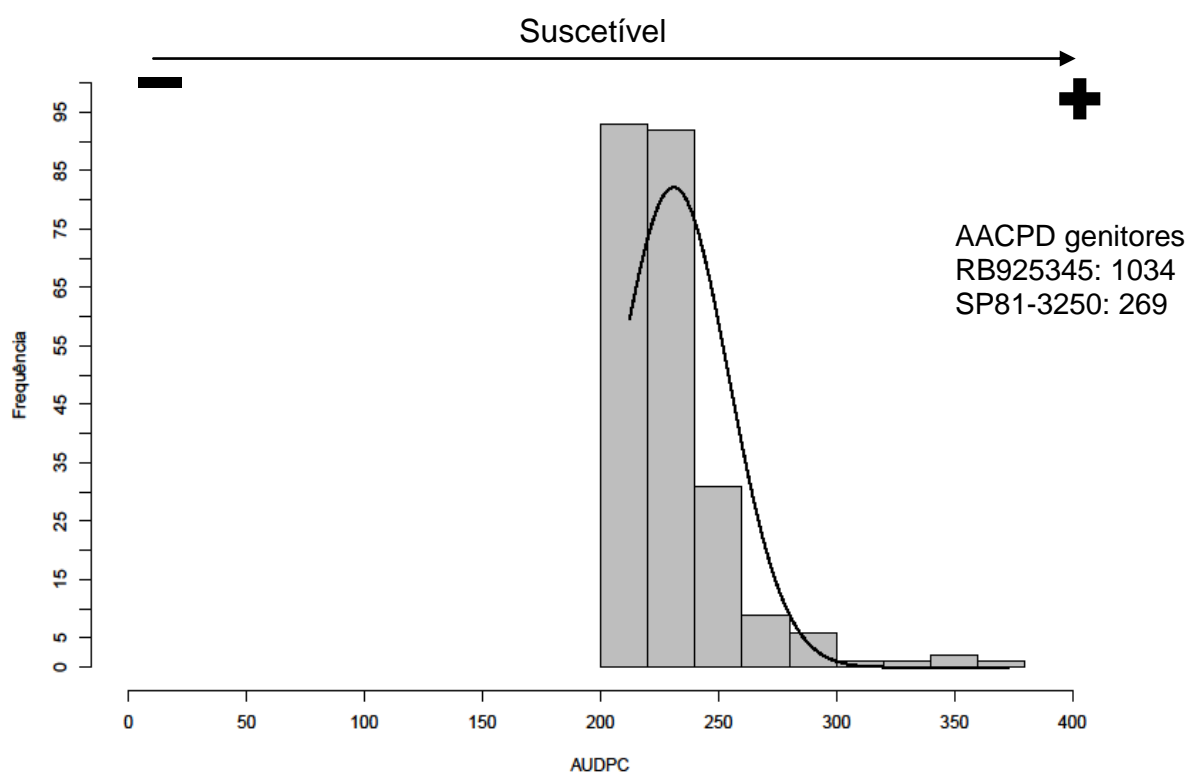


Figura 13. Distribuição dos valores de AACPD (BLUPs) na progênie F1 oriunda do cruzamento entre os genitores SP81-3250 e RB925345, representada a frequência de genótipos com os valores da área. Indicação da curva de tendência dos valores de AACPD (BLUPs) e do nível de suscetibilidade em relação á área. Como legenda à direita estão os valores da área calculados para os genitores, no experimento II.

No experimento II, as correlações não chegaram a 100% na Av.10, ou no meio do experimento, se mantendo estável com este valor de correlação antes do fim das avaliações, ao contrário do que se viu no experimento I. Este *heatmap* demonstrou que as correlações para este experimento II são altas em um primeiro momento, da Av.1 à Av.16, e a partir daí, há uma queda da correlação entre avaliações para ser alta novamente ao fim do experimento, nas avaliações 18 até a 25.

Estas correlações não vão apenas aumentando, como observado no experimento I, ocorre o aumento de correlação da primeira à oitava avaliação, havendo então um decréscimo a partir da décima, ocorrendo o menor valor de correlação na Av.17, onde as correlações começam a aumentar. As correlações entre avaliações passam a ser de alto valor na Av.19, indicando que os resultados a partir desta, não se diferem com o das demais avaliações, até chegar à 25ª. Assim como ocorreu no experimento I a partir da avaliação 13.

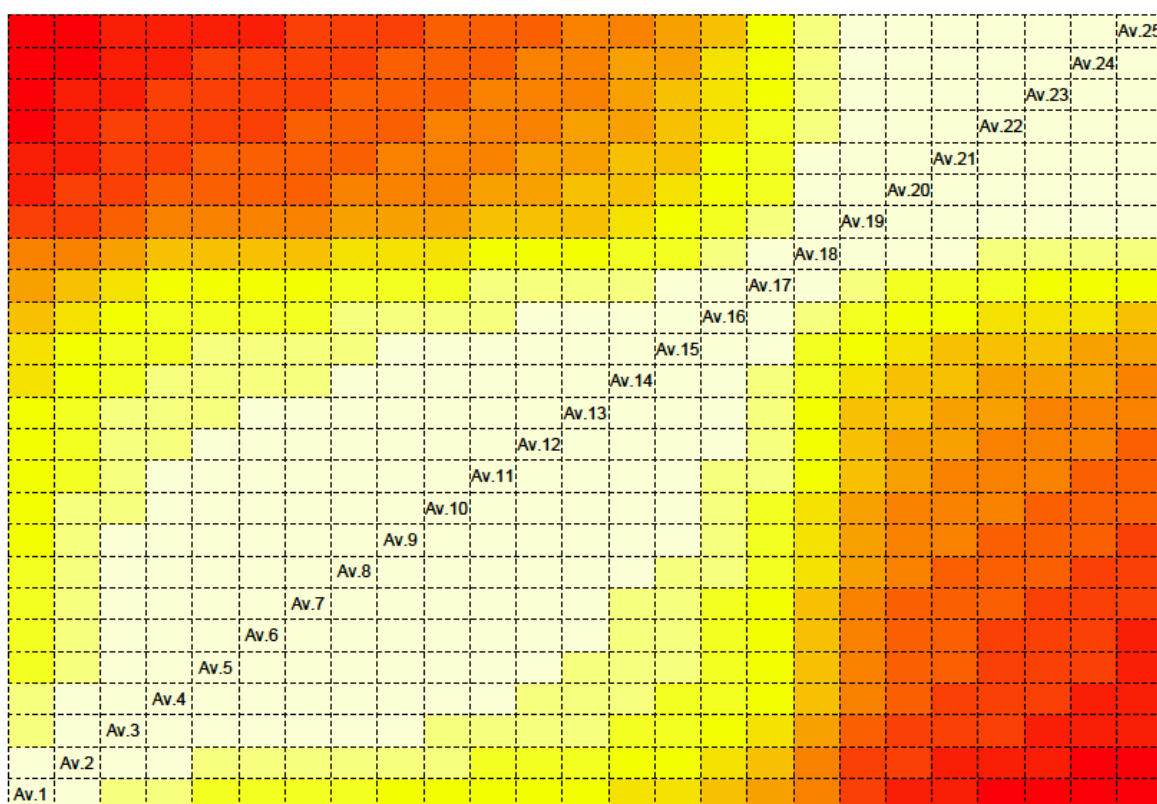


Figura 14. Representação gráfica da correlação entre as avaliações de carvão em cana-de-açúcar. As 25 avaliações estão representadas na diagonal com o número das respectivas realizadas ao longo de 198 dias. As cores mais quentes representam maior distância entre as correlações. Em bege estão valores de 1-0,95; amarelo claro 0,94-0,90; amarelo 0,89-0,78; laranja claro 0,77-0,69; laranja 0,68-0,58 e vermelho 0,57-0,38.

O valor de herdabilidade (h^2) no experimento II é baixo tanto na herdabilidade no sentido amplo de plantas individuais quanto em médias ao considerar as duas repetições contidas no experimento. Sendo que o valor de h^2 média é de 0,09 e 0,05 em planta individual. Como as demais variáveis, a herdabilidade foi calculada para cada uma das 25 avaliações, sendo que a amplitude entre as avaliações iniciais e finais é muito pequena. Da primeira à vigésima quinta avaliação os valores de h^2 , variam em 0,05. A h^2 _médias possui amplitude igualmente baixa, variando em 0,09 durante todo o experimento, nas suas 25 avaliações. Este valor baixo na herdabilidade foi causado pela baixa incidência que ocorreu no experimento II, uma vez que a herdabilidade é calculada baseada na variância genética (RAMALHO et al., 1993), a qual foi igualmente baixa.

A incidência, ou seja, o valor de quantidade de chicote que surgiu a cada genótipo foi cumulativo para o cálculo da área. As figuras 8 e 9 servem para melhor ilustrar o progresso da doença, sendo possível observar que a área abaixo da curva de progresso, sempre que apresenta a doença, aumenta com o decorrer do tempo, independente do surgimento de novos chicotes. Genótipos que demoram mais tempo para expressar a doença seriam então os menos suscetíveis, pois apresentam uma área total final menor, em relação com aquelas que apresentaram o sintoma previamente e em maior quantidade. O mesmo foi observado para estudo de Rago et al. (2009) ao utilizar a AACPD para o carvão em cana-de-açúcar.

Tabela 3. Estimativa da variância genética, variância ambiental, influência da repetição, padrões e germinação e do coeficiente de herdabilidade no sentido amplo individual e em média na progênie F₁ observada ao longo de 25 avaliações para incidência do carvão no experimento II.

Avaliação	Variância genética	Variância ambiental	Repetição	Padrões	Germinação	h ²	h ² _ média	Média
1	0,00	3,55	0,08	0,25	0,47	0,00	0,00	0,34
2	0,03	21,90	0,05	0,46	0,46	0,00	0,00	0,79
3	0,59	69,84	0,04	0,62	0,35	0,01	0,02	1,31
4	2,20	148,20	0,03	0,75	0,29	0,01	0,03	2,05
5	4,90	268,40	0,04	0,83	0,25	0,02	0,04	3,06
6	7,90	402,80	0,04	0,86	0,23	0,02	0,04	3,93
7	11,80	598,50	0,04	0,89	0,23	0,02	0,04	4,94
8	17,10	893,00	0,05	0,91	0,25	0,02	0,04	6,10
9	23,00	1229,00	0,05	0,91	0,26	0,02	0,04	7,27
10	29,00	4230,00	0,06	0,89	0,26	0,01	0,01	8,27
11	41,00	1991,00	0,06	0,87	0,27	0,02	0,04	9,72
12	58,00	2549,00	0,07	0,86	0,28	0,02	0,04	11,17
13	88,00	3310,00	0,07	0,83	0,29	0,03	0,05	13,45
14	126,00	4184,00	0,07	0,78	0,30	0,03	0,06	16,39
15	155,00	4983,00	0,08	0,75	0,32	0,03	0,06	19,18
16	202,00	7017,00	0,10	0,68	0,36	0,03	0,05	27,58
17	315,00	9424,00	0,10	0,60	0,37	0,05	0,06	37,76
18	819,00	16477,00	0,08	0,48	0,39	0,05	0,09	61,57
19	1925,00	33963,00	0,08	0,31	0,43	0,05	0,10	103,06
20	2652,00	46842,00	0,08	0,24	0,45	0,05	0,10	127,87
21	3206,00	57415,00	0,08	0,21	0,46	0,05	0,10	146,01
22	3816,00	69353,00	0,08	0,19	0,46	0,05	0,10	164,53
23	4368,00	80747,00	0,08	0,17	0,47	0,05	0,10	180,73
24	5099,00	91668,00	0,09	0,16	0,47	0,05	0,09	202,84
25	6058,00	121526,00	0,09	0,14	0,48	0,05	0,09	231,09

A tabela 2 demonstra que todas variáveis calculadas para aumentam à medida que se aumenta o número de avaliações, sendo este aumento observado com significância entre a primeira e última avaliações. A variável "Repetições" é a única que tem alguma influência nos resultados, por se apresentar significativa a partir da quinta avaliação à vigésima quinta, no experimento I. O mesmo não se repete para o experimento II, onde esta variável não se demonstra significativa.

No experimento II a herdabilidade foi muito baixa devido à baixa incidência da doença durante todo o experimento, não sendo obtidas no experimento II então, informações significativas. Isto é justificado pelo fato da herdabilidade ser um cálculo que leva em consideração a variância genética sobre a fenotípica (RAMALHO et al., 1993), como observado na Tabela 3, a variância genética neste experimento foi baixa por ter ocorrido pouca doença. A herdabilidade moderada visto do ponto de vista genético, neste caso explica pouco em relação à característica de resistência da cana-de-açúcar a doença do carvão, dado que se comprova pelo fato de a variação genética ser bem menor do que a ambiental em ambos e durante todas as avaliações (CHAO et al., 1990; MORAIS, 2013; RABOIN et al., 2003; WU et al., 1988).

5.3. Mapeamento de QTL

A busca por associação entre os marcadores moleculares e valores de AACPD foi realizada utilizando a metodologia de marca simples (SM) a qual não utiliza o mapa de ligação para achar associação entre fenótipo e genótipo. Foram utilizados para este fim, todos os marcadores moleculares com segregação de marca simples (1:1 e 3:1). Considerando a baixa saturação do mapa de ligação e a quantidade de marcas simples que segregavam como o esperado, mas que não ligaram no mapa de ligação gerado, esta forma de buscar a associação é a melhor metodologia para este fim. Utilizando como limiar o LOD Score 3, com correção de Bonferroni a 5%, um marcador molecular apresentou associação significativa para o primeiro estudo. O marcador SCB370.1D1 apresentou associação significativa da décima terceira (102 dias) à vigésima quinta (263 dias de avaliação) avaliação, no primeiro ano do experimento, sendo que a medida que a área abaixo da curva de progresso da doença vai aumentando (avaliações consecutivas), maior vai se tornando a significância da marca (Figura 15). No segundo ano do experimento, utilizando os mesmos parâmetros adotados, não foi possível observar associação significativa entre fenótipo e genótipo, conforme observado na Figura 16. Como dito anteriormente, isto pode ser explicado pela baixa incidência da doença ocorrida neste experimento.

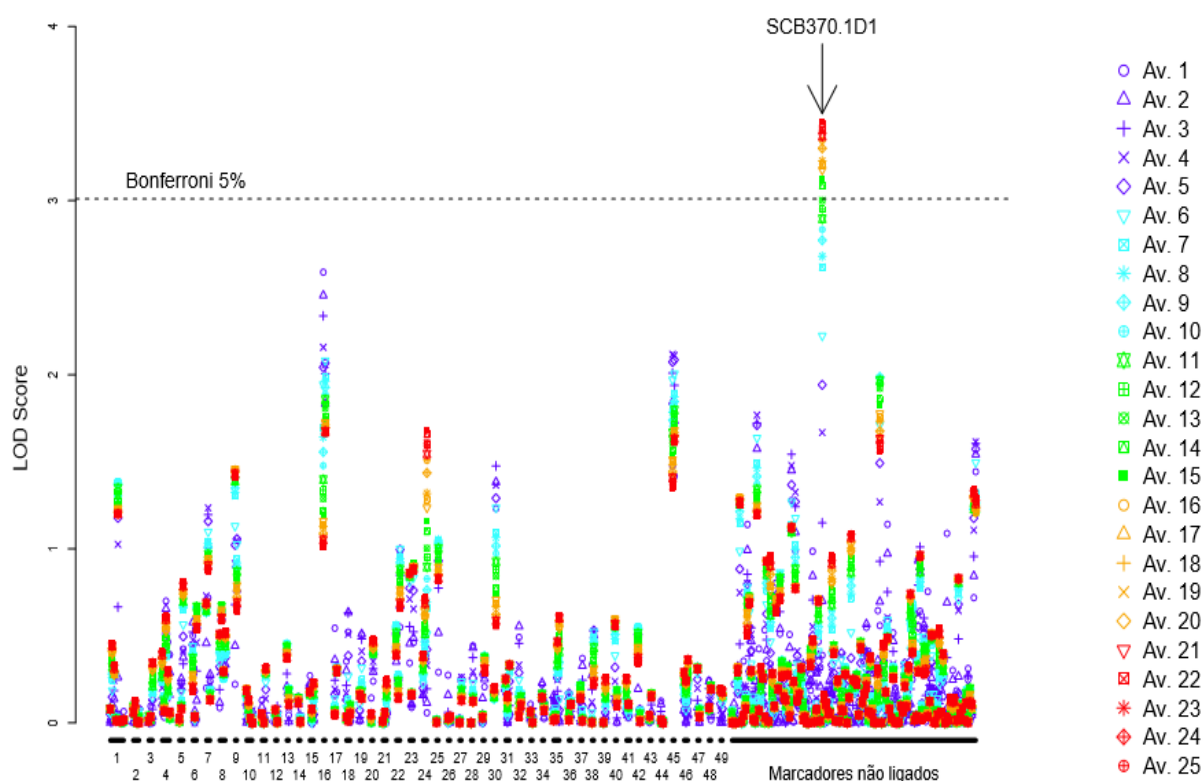


Figura 15. Avaliação de marca simples para todos os marcadores microssatélites com segregação de marca única (1:1 e 3:1), as marcas estão indicadas na ordem em que aparecem nos grupos de ligação. Os números indicados abaixo são dos grupos de ligação, seguidos de marcadores não ligados. Na vertical estão os valores de LOD Score com correção de Bonferroni a 5%, indicando o valor limiar de LOD Score, 3. As cores indicam as avaliações de 1-25. Também está indicado o marcador que foi significativo.

O marcador molecular SCB 370 não foi alocado nos grupos de ligação do mapa genético. Este marcador é do tipo D1 e foi oriundo do genitor, SP81-3250, que é considerado como genitor resistente. Isso pode indicar que a variedade apresenta alelo de suscetibilidade à doença, mesmo que neste experimento ela não tenha emergido nenhum chicote. Embora, ao acrescentarmos o segundo experimento, este genitor apresente incidência à doença. Ainda neste experimento, não houve surgimento de nenhuma marca significativa, nem mesmo a presente para o primeiro ano.

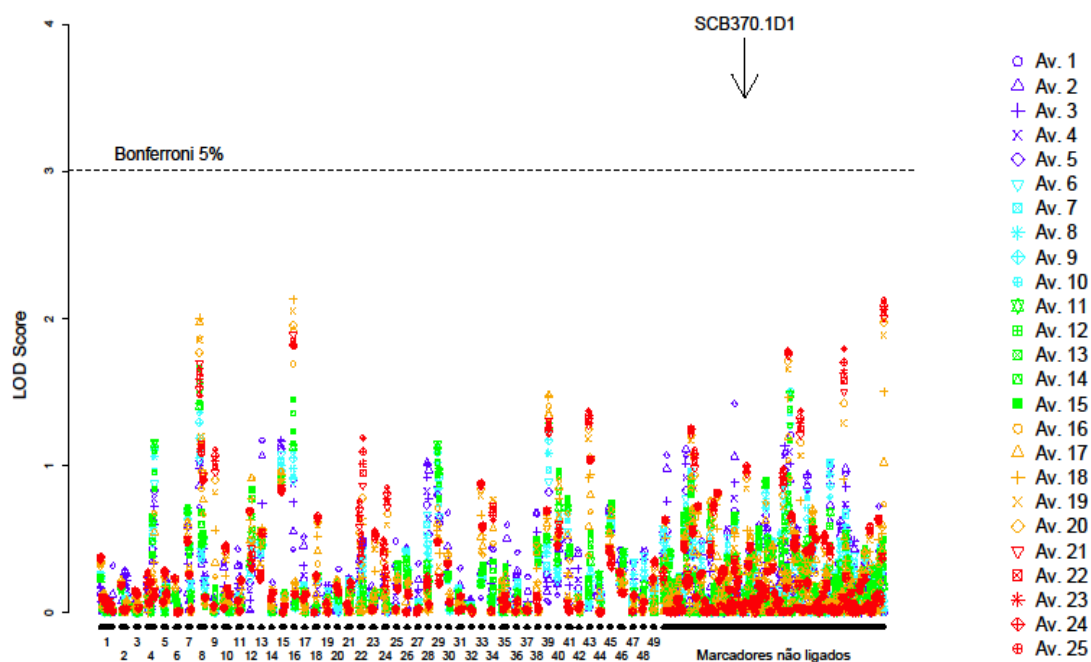


Figura 16. Avaliação de marca simples para todos os marcadores microssatélites com segregação de marca única (1:1 e 3:1), as marcas estão indicadas na ordem em que aparecem nos grupos de ligação. Os números indicados abaixo são dos grupos de ligação, seguidos de marcadores não ligados. Na vertical estão os valores de LOD Score com correção de Bonferroni a 5%, indicando o valor limiar de LOD Score, 3. As cores indicam as avaliações de 1-25. Também está indicado o marcador que foi significativo.

No trabalho de Moraes (2013) processo semelhante pode ser visto, uma vez que houve sintoma, aparecimento de chicotes, na variedade utilizada como parental resistente. São considerados genótipos transgressivos, uma vez que ambos os genitores possuem alelos que conferem suscetibilidade à doença, o genitor mais resistente não é o extremo de resistente conferindo incidência igual à zero em todo experimento e o suscetível não apresenta o maior valor de suscetibilidade, foi observada uma progênie com valores de suscetibilidade bem maior do que o parental com esta característica. Nenhum marcador ligado mostrou associação significativa com a característica fenotípica em estudo em nenhum momento.

A marca significativa apresentou efeito positivo no fenótipo, explicando 6% da variação fenotípica. Quanto maior a área calculada mais associação essa marca tem com a característica de surgimento da doença, então se conclui que o marcador está associado à suscetibilidade da doença, o que possibilitaria a melhoramento de modo reverso. Quem apresenta a marca, não deveria ser escolhido como genótipo a ser utilizado nos programas de melhoramento.

O marcador SCB370 é descrito por Marconi et al. (2011) como sendo uma VAMP (*Vesicle-Associated Membrane Protein* – acesso no NCBI “001150642”) em cana-de-açúcar. Esta proteína também é descrita em outras culturas, tais como *Arabidopsis thaliana* (HOEPFLINGER et al., 2014; ICHIKAWA et al., 2015; YI et al., 2013), milho (CHEN et al., 2015) dentre outras, inclusive humanos. As VAMPs são proteínas receptoras envolvidas no transporte e fusão de vesículas em membranas alvo (ICHIKAWA et al., 2015).

O carvão em cana-de-açúcar é uma doença abordada em todos os locais em que há o plantio de cana-de-açúcar e é considerado em todos os programas de melhoramento mundiais de cana-de-açúcar. Porém, estudos com esta doença apresenta grande dificuldade em encontrar e validar respostas, como quais genes estão relacionados com a doença (MORAIS, 2013).

6 CONCLUSÕES

Com base nos resultados deste trabalho foi possível concluir que:

- a) A população utilizada neste estudo, progênie de variedades comerciais, tem diferentes amplitudes de AACPD ao longo das avaliações realizadas.
- b) O genitor resistente utilizado neste trabalho apresentou doença no experimento II, indicando que este genitor possui alelo de suscetibilidade ao carvão.
- c) A temperatura foi importante fator para desenvolvimento do carvão em cana-de-açúcar, podendo ter afetando a associação entre marcador microssatélite e a resposta de resistência/susceptibilidade.
- d) A alta correlação entre avaliações no experimento I indica que este poderia ser finalizado na avaliação 10, reduzindo tempo de realização dos experimentos. Sem descartar a importância da realização de experimentos em diferentes condições climáticas, mas isto interfere na resposta à doença.
- e) A herdabilidade variou ao longo das semanas de avaliação.
- f) A metodologia de marca simples (SM) foi eficiente em identificar uma associação significativa entre valores de AACPD e marcadores moleculares, no experimento I, explicando 6% da variação fenotípica.

7 LITERATURA CITADA

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

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

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

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

ALJANABI, S.M.; PARMESSUR, Y.; KROSS, H.; DHAYAN, S.; SAUMTALLY, S.; RAMDOYAL, K.; AUTREY, L.J.C.; DOOKUN-SAUMTALLY, A. Identification of a major quantitative trait locus (QTL) for yellow spot (*Mycovellosiella koepkei*) disease resistance in sugarcane. *Molecular Breeding*, v. 19, p. 1-14, 2007.

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

AMORIM, L.; BERGAMIN, A.F. Sugarcane smut development models: I. Annual curves of disease progress. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheitenschutz und Pflanzenschutz*, v. 98, p.605-612, 1991.

AMORIM, L., BERGAMIN FILHO, A., HAU, B. Analysis of progress curves of sugarcane smut on different cultivars using functions of double sigmoid pattern. *Phytopathology*, v. 83, p. 933-936, 1993.

AMORIM, L. Avaliação de doenças. IN: BERGAMIN, A.F.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Eds.) *Manual de fitopatologia: princípios e conceitos*. 3ª ed. São Paulo: Agronômica Ceres, v.1, p.647-670, 1995.

AMORIM, L.; BERGAMIN-FILHO, A. HAU, B.; BERGER, R.D. Effects of sugarcane wounded-bud inoculation of *Ustilago scitamea* on the disease process curve and yield. *Fitopatologia Brasileira*, v. 25, p. 522-528, 2000.

ANONI, C.O. Mapeamento de QTLs em progênie de irmãos-completos de cana-de-açúcar utilizando imputação múltipla. Piracicaba [Dissertação de Mestrado em (Ciências: Genética e Melhoramento de Plantas) / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo], 2011.

ANONI, C.A.; MANCINI, M.C.; COSTA, E.A.; GAZAFFI, R.; PASTINA, M.M.; PERECIN, D.; PINTO, L.R.; SOUZA, A.P.; GARCIA, A.A.F. Mapping Quantitative Trait Loci for yield components in a bi-parental cross between two commercial sugarcane (*Saccharum* spp.) varieties. *Theoretical Applied Genetics*, in press, 2014.

ANTOINE, R. Smut. In: MARTIN, J.P.; ABBOTT, E.V.; HUGHES, C.G. *Sugarcane Diseases of the World*. p. 326-353, 1961.

BALSALOBRE, T.W.A.; MANCINI, M.C.; PEREIRA, G.S.; ANONI, C.O.; BARRETO, F.Z.; HOFFMANN, H.P.; SOUZA, A.P.; GARCIA, A.A.F.; CARNEIRO, M.S. A mixed-model approach for analysis of yield components and brown rust resistance in full-sib families of sugarcane. *Agronomy Journal*, in press, 2016.

BANERJEE, N.; SIRAREE, A.; YADAV, S.; KUMAR, S. et al. Marker-trait association study for sucrose and yield contributing traits in sugarcane (*Saccharum* spp. hybrid). *Euphytica*, versão online, 2015.

BARBOSA, M.H.P.; SILVEIRA, L.C.I. Melhoramento genético e recomendação de cultivares. In: SANTOS, F.; BOREM, A.; CALDAS, C. *Cana-de-açúcar – Bioenergia, açúcar e etanol – Tecnologia e perspectivas*, 2ª ed, p. 313-331, 2012.

BEDENDO, I.P. Ambiente e Doença. In: BERGAMIN, A.F.; KIMATI, H.; AMORIM, L. *Manual de fitopatologia: princípios e conceitos*. 3ª ed. São Paulo: Agronômica Ceres, v.1, p.331-341, 1995.

BERGAMIN, A.; AMORIM, L.; CARDOSO, C.O.N.; SANGUINO, A.; IRVINE, J.E.; SILVA, W.M. Carvão da cana-de-açúcar e sua epidemiologia. *Boletim Técnico Copersucar*, p. 1-23, 1987. Edição especial.

BERGAMIN, A.F. Curvas de progresso da doença. IN: *Manual de fitopatologia: princípios e conceitos*. 3ª ed. São Paulo: Agronômica Ceres, v.1, 602-625, 1995.

BERGAMIN, A.F.; KIMATI, H.; AMORIM, L. *Manual de fitopatologia: princípios e conceitos*. 3ª ed. São Paulo: Agronômica Ceres, v.1, 1995. 919p.

BERGAMIN, A.F.; AMORIM, L. *Doenças de plantas tropicais: Epidemiologia e controle econômico*. São Paulo, Ceres. 1996. 299p.

BESPALHOK F., J.C.; GUERRA, E.P.; OLIVEIRA, R. Melhoramento para resistência a doenças. In: BESPALHOK F., J.C.; GUERRA, E.P.; OLIVEIRA, R. *Melhoramento de Plantas*. 2007. p.11-18.

BHUIYAN, S.A.; CROFT, B.J.; COX, M.C.; BADE, G. Varietal Resistance of sugarcane to natural infection of smut – preliminar results. *Proceedings of the Australian Society of Sugar Cane Technology*, v. 32, p. 355-365, 2010.

BHUIYAN S. A.; CROFT, B.J.; JAMES, R.S.; COX, M.C. Laboratory and field evaluation of fungicides for the management of sugarcane smut caused by *Sporisorium scitamineum* in seedcane. *Australasian Plant Pathology*, v. 41, n. 6, p.591-599, 13 abr. 2012.

- BOCK, K.R. Studies on sugar-cane smut (*Ustilago Scitaminea*) in Kenya. *Transactions of the British Mycological Society*, v. 47, n. 3, p. 403-417, 1964.
- BOLDRINI, J.M. Padronização de métodos para inoculação de *Sporisorium scitamineum* em testes de resistência ao carvão da cana-de-açúcar. Jaboticabal [Tese de Doutorado em (Agronomia: Genética e Melhoramento de Plantas) / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Universidade Estadual Paulista], 2016.
- BOREM, A.; SILVA, J.A.; DIOLA, V. Biologia molecular e Biotecnologia. In: SANTOS F.; BOREM, A.; CALDAS, C. *Cana-de-açúcar – Bioenergia, açúcar e etanol – Tecnologia e perspectivas*, 2ª ed, p. 355-378, 2012.
- BORRAS-HIGALGO, O.; THOMMA, B.P.H.J.; CARMONA, E.; BORROTO, C.J.; PUJOL, M.; ARENCIBIA, A.; LOPEZ, J. Identification of sugarcane genes induced in disease-resistant somaclones upon inoculation with *Ustilago scitaminea* or *Bipolaris sacchari*, *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 43, p. 1115-1121, 2005.
- BUENO, C.R.N.C. Infecção por *Sporisorium scitamineum* em cana-de-açúcar: influência de variáveis ambientais e desenvolvimento de método para diagnose precoce. Piracicaba [Tese de Doutorado em (Agronomia: Fitopatologia) / Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo], 2010.
- BURNER, D.M.; LEGENDRE, B.L. Chromosome transmission and meiotic stability of sugarcane (*Saccharum* spp.) hybrid derivatives. *Crop Science*, v. 33, p. 600-606, 1993.
- BUTTERFIELD, M.K. Marker assisted breeding in sugarcane: a complex polyploidy. Matieland [Tese de Doutorado / University of Stellenbosch], 2007.
- CAMARGO, L.E.A. Análise genética da resistência e da patogenicidade. In: BERGAMIN, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. *Manual de Fitopatologia: princípio e conceitos*, v. 1, ed 3, p. 470-491, 1995.
- CAMPBELL, C.L.; MADDEN, L.V. *Introduction to plant disease epidemiology*. 532p., 1990.
- CARNEIRO, M.S.; VIEIRA, M.L.C. Mapas genéticos em plantas. *Bragantia*, v. 61, n. 2, p.89-100, 2002.
- CARVALHO, S.A.D.; FURTADO, A.T. O melhoramento genético de cana-de-açúcar no Brasil e o desafio das mudanças climáticas globais. *Revista Gestão & Conexões*, v. 2, n. 1, p. 22-46, jan/jun. 2013.
- CARVALHO, G.; QUECINE, M.C.; LONGATTO, D.P., et al. *Sporisorium scitamineum* colonisation of sugarcane genotypes susceptible and resistant to smut revealed by GFP-tagged strains. *Annals of Applied Biology*, p.1-13, jul. 2016.

CASAGRANDE, M.V.; AMORIM, L.; SANGUINO, A. Relação entre incidência de carvão e danos em diferentes estádios de desenvolvimento da cana-de-açúcar. *Fitopatologia Brasileira*, v. 23, p. 374-378, 1998.

CESNIK, R.; MIOCQUE, J., 2004. *Melhoramento da Cana-de-açúcar*. Embrapa. Brasília, 2004.

CHANDIPOSHA, M. Potential impact of climate change in sugarcane and mitigation strategies in Zimbabwe. *African Journal of Agricultural Research*, v. 8, n. 23, p. 2814-2818, jun. 2013.

CHAO, C.P.; HOY, J.W.; SAXTON, A.M. Heritability of resistance and repeatability of clone reactions to sugarcane smut in Louisiana. *Phytopathology*, v.80, n. 7, p. 662-626, 1990.

CHEN, J.W.; KUANG, J.F.; PENG, G.; WAN, S.B. et al. Molecular cloning and expression analysis of a NPR1 gene from sugarcane. *Pakistan Journal Of Botany*, v. 44, n. 1, p.193-200, 2012.

CHEN, Y.; ZONG, J.; TAN, Z. et al. Systematic mining of salt-tolerant genes in halophyte-Zoysia matrella through cDNA expression library screening. *Plant Physiology And Biochemistry*, v. 89, p.44-52, abr. 2015.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. Disponível em:<http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_04_14_09_06_31_bol_etim_cana_portugues_-_4o_lev_-_15-16.pdf>. Acesso em: 25 de junho de 2016.

CORTEZ, 2010; GAZAFFI, R.; OLIVEIRA, K.M.; SOUZA A.P.; GARCIA A.A.F. Melhoramento Genético e Mapeamento da Cana-de-açúcar. In: Cortez LAB (Ed.) *Bioetanol de cana-de-açúcar*. P&D para produtividade e sustentabilidade. 1. ed. Edgar Blücher Ltda, 2010. 992 p.

COX, M.; CROFT, B.; BONNETT, G. Smutbuster: accelerated breeding of smut-resistant sugarcane varieties. *BSES: Sugarcane for the future*. BSES Limited: Australian, june 2011. 73 p.

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

CROFT, B.J.; MAGAREY, R.C.; ALLSOPP, P.G.; COX, M.C.; WILLCOX, T.G.; MILFORD, B.J.; WALLIS, E.S. Sugarcane smut in Queensland: arrival and emergency response. *Australasian Plant Pathology*, v. 37, p. 26–34, 2008.

D'HONT, A.; ISON, D.; ALIX, K.; ROOUX, C.; GLASZMANN, J.C. Determination of basic chromosome numbers in the genus *Saccharum* by physical mapping of ribosomal RNA genes. *Genome*, v. 41, p. 221-225, 1998.

DALVI, S. G.; VASEKAR, V.C.; YADAV, A.; TAWAR, P.N.; DIXIT, G.B.; PRASAD, T.; DESHMUKH, R.B. Screening of Promising Sugarcane Somaclones for Agronomic

Traits, and Smut Resistance Using PCR Amplification of Inter Transcribed Region (ITS) of *Sporisorium scitaminae*. *Sugar Tech*, v. 14, n. 1, p.68-75, 2012.

DANIELS, J.; ROACH, B.T., 1987. Sugarcane improvement through breeding. *Taxonomy and evolution*, v. 11, p. 7-84, 1987.

DING, J.; WANG, X.; CHANDER, S.; LI, J.. Identification of QTL for maize resistance to common smut by using recombinant inbred lines developed from the Chinese hybrid Yuyu22. *Journal Of Applied Genetics*, v. 49, n. 2, p.147-154, jun. 2008.

DOERGE, R.W. Multifactorial genetics mapping and analysis of quantitative trait loci in experimental populations. *Nature Reviews Genetics*, v. 3, n. 1, p.43-52, jan. 2002.

Dos REIS, G.V. Diversidade genética de isolados do fungo *Sporisorium scitamineum* analisada através de fingerprinting da região telomérica. Piracicaba [Dissertação de Mestrado em (Ciências: Microbiologia Agrícola) / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo], 2012.

EDMÉ, S.J.; GLYNN, N.G.; COMSTOCK, J.C. Genetic segregation of microsatellite markers in *Saccharum officinarum* and *S. spontaneum*. *Heredity*, v. 97, n. 5, p.366-375, ago. 2006.

EDWARDS, M.D.; STUBER, C.W.; WEMDELL, J.F. Molecular marker-facilitated investigations of quantitative trait loci in maize. Numbers, genomic distribution and types of gene action. *Genetics*, v. 116, p. 113-125, 1987.

FALCONER, D.S.; MACKAY, T.F.C. *Introduction to Quantitative Genetics*. 4^a ed. Essex, UK: Longman, 1996. 464 p.

FALEIRO, F.G. *Marcadores genético-moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos*. Embrapa Cerrados, p. 102, 2007.

FERREIRA, S.A.; COMSTOCK, J.C. Smut in: RICAUD, C.; EGAN, B.T.; GILLASPIE, A.G.; HUGHES, C.D. (Ed.). *Diseases of Sugarcane – Major diseases*, p. 211-229, 1989.

FERREIRA M. E.; GRATTAPAGLIA D. *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*. Embrapa/Cenargen, 3 ed., 1998.

FLOR, H.H. Inheritance of pathogenicity in *Melampsora lini*. *Phytopathology*, v. 32, p. 653-669, 1942.

GDALETA, A. GIANCASPRO, A.; ZACHEO, S.; NIGRO, D. et al. Comparison of genomic and EST-derived SSR markers in phylogenetic analysis of wheat. *Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization*, v. 9, n. 2, p. 243-246, 2011.

GARCIA, A.A.F.; KIDO, E.A.; MEZA, A.N.; SOUZA, H.M.B.; PINTO, L.R.; PASTINA, M.M.; LEITE, C.S.; Da SILVA, J.A.G.; ULIAN, E.C.; FIGUEIRA, A.V.O.; SOUZA, A.P. Development of an integrated genetic map of a sugarcane (*Saccharum* spp.)

commercial cross, based on a maximum-likelihood approach for estimation of linkage and linkage phases. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 112, p. 298-314, 2006.

GAZAFFI, R.; OLIVEIRA, K.M.; SOUZA, A.P.; GARCIA, A.A.F. Melhoramento genético e mapeamento da cana-de-açúcar. In: CORTEZ, L.A.B. *Bioetanol de cana-de-açúcar*. P&D para produtividade e sustentabilidade, Edgar Blücher Ltda, p. 333-343, 2010.

GIANOTTO, A. C.; ABREU, H.M.C.; ARRUDA, P. et al. Sugarcane (*Saccharum X officinarum*): A Reference Study for the Regulation of Genetically Modified Cultivars in Brazil. *Tropical Plant Biology*, v. 4, n. 1, p.62-89, 2011.

GOUY, M.; ROUSSELLE, T.; CHANE, A.T. et al. Genome wide association mapping of agro-morphological and disease resistance traits in sugarcane. *Euphytica*, v. 202, p.269-284, 2015.

GRANT, V. *The architecture of the germplasm*. New York: John Wiley & Sons, cap 4, 1964.

GRATTAPAGLIA, D.; SEDEROFF, R. Genetic Linkage Maps of *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus urophylla* Using a Pseudo-Testcross: Mapping Strategy and RAPD Markers. *Genetics*, v. 137, p. 1121-1137, 1994.

HAUKSWORTH, D.L.; KIRK, P.M.; SUTTON, B.C.; PEGLER, D.N. *Ainsworth & Bisby's dictionary of the fungi*. 8^a ed: CAB International, 1995. 616p.

HOEPFLINGER, M.C.; HAMETNER, C.; UEDA, T.; FOISSNER, I. Vesicular trafficking in characean green algae and the possible involvement of a VAMP72-family protein. *Plant Signaling & Behavior*, v. 9, n. 4. 2014.

HU, J.; WANG, L.; LI, J. Comparison of genomic SSR and EST-SSR markers for estimating genetic diversity in cucumber. *Biologia plantarum*, v. 33, n. 3, p. 577-580, 2011.

ICHIKAWA, Mie et al. A VAMP-associated protein, PVA31 is involved in leaf senescence in Arabidopsis. *Plant Signaling & Behavior*, v. 10, n. 3, p.1-8, mar. 2015.

IRVINE, J.E. *Saccharum* species as horticultural classes. *Theoretical and Applied Genetics*, v.98, p. 186-194, 1999.

JANSEN, R.C.; STAM, P. High resolution of quantitative traits into multiple loci via interval mapping. *Genetics*, v. 136, p. 1447-1455, 1994.

JUANGBHANICH, P.; WANGWON, S. Effect of temperature and some substrate on teliospore germination of sugarcane smut and inoculation methods on infection by *Ustilago scitaminea*. *Kasetsart journal: natural sciences*, v. 17, n. 2, p. 45-52, jul. 1983.

KAO, C.H.; ZENG, Z.B.; TEASDALE, R.D. Multiple interval mapping for quantitative trait loci. *Genetics*, v. 152, p. 1203-1216, 1999.

KRUGNER, T.L. A natureza da doença. In: BERGAMIN, A.F.; KIMATI, H.; AMORIM, L. *Manual de fitopatologia: princípios e conceitos*. 3ª ed. São Paulo: Agronômica Ceres, v.1, p.34-43, 1995.

LAKSHMANAN, P.; GEIJSKES, R.J.; AITKEN, K.S.; GROF, C.L.P.; et al. Invited Review: Sugarcane Biotechnology: The challenges and opportunities. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, v. 41, p. 345-363, 2005.

LANDER, E.S.; GREEN, P. Construction of multilocus genetic linkage maps in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 84, p. 2363-2367, 1987.

LANDER, E.S.; BOTSTEIN, D. Mapping Mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics*, v. 121, p. 185-199, 1989.

LÜBBERSTEDT, T; XIA, X.C.; LIU, X.; MELCHINGER, A.R.. QTL mapping of resistance to *Sporisorium reilianum* in maize. *Theoretical And Applied Genetics*, v. 99, n. 3-4, p.593-598, ago. 1999.

LYNCH, M.; WALSH, B. Genetics and analysis of quantitative traits. Sunderland: Sinauer Associates, 1998. 980p.

MACHADO, F.B.P. O açúcar nos 500 anos do Brasil. *Revista STAB*, v. 18, p. 4-15, 2000.

MAGALHAES, P.S.G.; BRAUNBECK, O.A. Introdução. In: CORTEZ, L.A.B. *Bioetanol de cana-de-açúcar: P&D para produtividade e sustentabilidade*, Edgar Blücher Ltda, p. 319-323, 2010.

MAGAREY, R.C.; CROFT, B.J.; BULL, J.I.; GREET, A.D.; JAMES, A. The resistance of the Australian sugarcane germplasm to diseases in Queensland. *Proc Aust Soc Sugar Cane Technol*, v. 27, p.199–210, 2005

MANCINI, M.C. Construção de um mapa funcional e detecção de QTLs de importância econômica em uma população derivada de cruzamento bi-parental entre duas variedades comerciais em cana-de-açúcar. Campinas [Tese de Doutorado em (Genética e Biologia Molecular: Genética Vegetal e Melhoramento) / Instituto de Biologia- Universidade Estadual de Campinas], 2014.

MARCONI, T.G.; COSTA, E.A.; MIRANDA, H.R.C.A.N.; MANCINI, M.C.; CARDOSO-SILVA, C.B.; OLIVEIRA, K.M.; PINTO, L.R.; MOLLINARI, M.; GARCIA, A.A.F.; SOUZA, A.P. Functional markers for gene mapping and genetic diversity studies in sugarcane. *BMC Research Notes*, v. 4, p. 264, 2011.

MARGARIDO, G. R. A.; SOUZA, A. P.; GARCIA, A. A. F. OneMap: software for genetic mapping in outcrossing species. *Hereditas*, v. 144, n. 3, p.78-79, jun. 2007.

MARGARIDO, G.R.A. Mapeamento de QTLs em múltiplos caracteres e ambientes em um cruzamento comercial de cana-de-açúcar usando modelos mistos. Piracicaba

[Tese de Doutorado em (Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo], 2011.

MARQUES, J.P.; GLÓRIA, B.A.; PIEPENBRING, M. et al. Sugarcane smut: shedding light on the development of the whip-shaped sorus. *Annals of Botany*, p.1-13, ago. 2016

MORAIS, T.B.R. Mapa de ligação e mapeamento de locos quantitativos de resistência a *Sporisorium scitamineum* em cana-de-açúcar. Piracicaba [Tese de Doutorado em (Ciências: Genética e Melhoramento de Plantas) / Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo], 2013.

NUNES, C.M.C. Mapeamento de QTL em cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) utilizando marcadores DARt (DiversityArrays Technology) e microssatélites. Goiânia [Tese de Doutorado em (Agronomia: Genética e Melhoramento de Plantas) / EA, UFG], 2013.

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

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

OOIJEN, V.J.W.; VOORRIPS, R.E. *JoinMap 3.0*: Software for the calculations of genetic linkage maps. Wageningen: Plant Research International, 2001.

PALHARES, A.C.; MORAIS, T.B.R.; SLUYS, M.A.V.; DOMINGUES, D.S.; MACCHERONI, JR.W.; JORDÃO, JR. H.; MARCONI, T.G.; SOUZA, A.P.; MOLLINARI, M.; GAZAFFI, R.; GARCIA, A.A.F.; VIEIRA, L.M.C. A novel linkage map of sugarcane with evidence for clustering of retrotransposon-based markers. *BMC Genetics*, v. 13, p. 1-16, 2012.

PASTINA, M.M. Mapeamento de QTLs e estudo da interação entre QTLs, ambiente e cortes em cana-de-açúcar, usando a abordagem de modelos mistos. Piracicaba [Tese de Doutorado em (Ciências: Genética e Melhoramento de Plantas) / Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo], 2010.

PASTINA, M.M.; MALOSETTI, M.; GAZAFFI, R.; MOLLINARI, M.; MARGARIDO, G.R.A.; OLIVEIRA, K.M.; PINTO, L.R.; SOUZA, A.P.; EEUWIJK, F.A.V.; GARCIA, A.A.F. A mixed model QTL analysis for sugarcane multiple-harvest-location trial data. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 124, p. 835-849, 2012.

PAYNE, R.W.; MURRAY, D.A.; HARDING, S.A.; BAIRD, D.B.; SOUTAR, D.M. Introduction to GenStat 12 for Windows. *VSN International*, 2009. 37 p.

PEROS, J.P.; BAUDIN, P. Etude de la variabilité d' *Ustilago scitaminea* Syd., agent du carbon de la canne à sucre. *L'Agronomie Tropicale*, v. 38, p. 234-240, 1983.

PROGRAMA DE MELHORAMENTO GENÉTICO DE CANA-DE-AÇÚCAR DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS. Disponível em:<<http://pmgca.dbv.cca.ufscar.br/pmgca>>. Acesso às 13:00, 07 junho 2016.

PROGRAMA DE MELHORAMENTO GENÉTICO DE CANA-DE-AÇÚCAR DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA. Disponível em:<<http://www.canaufv.com.br/?pagina=pmgca>>. Acesso às 13:30, 07 junho 2016.

QUE, Y.X.; YANG, Z.X.; XU, L.O.; CHEN, R.K. Isolation and Identification of Differentially Expressed Genes in Sugarcane Infected by *Ustilago scitaminea*. *Acta Agronomica Sinica* v. 35, n. 3, p.452-458, 2009.

QUE, Y.; XU, L.; WU, Q.; LIU, Y.; LING, H.; LIU, Y.; ZHANG, Y.; GUO, J.; SU, Y.; CHEN, J.; WANG, S.; ZHANG, C. Genome sequencing of *Sporisorium scitamineum* provides insights into the pathogenic mechanisms of sugarcane smut. *BioMed Central Genomics*, v. 15, p. 996-1015, 2014.

RABOIN, L.M.; HOARAU, J.Y.; COSTET, L.; TELISMART, H.; GLASZMANN, J.C.; D'HONT, A. Progress in genetic mapping of sugarcane smut resistance. *Proceedings of the South African Sugar Technologists Association*, v. 77, p. 134-141, 2003.

RABOIN, L.M.; OLIVEIRA, K.M.; LECUNFF, L.; TELISMART, H.; ROQUES, D.; BUTTERFIEL, M.; HOARAU, J.Y.; D'HONT, A. Genetic mapping in sugarcane, a high polyploid, using bi-parental progeny: identification of a gene controlling stalk colour and A new rust resistance gene. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 112, n. 7, p. 1382-1391, 2006.

RAGO, A.M. Variabilidade patogênica de *Puccinia melanocephala* e *Ustilago scitaminea* no Estado de São Paulo. Piracicaba [Dissertação de Mestrado em (Agronomia: Fitopatologia) / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo], 2005.

RAGO, A.M.; CASAGRANDE, M.V.; MASSOLA JÚNIOR, N.S. Variabilidade patogênica de *Ustilago scitaminea* no Estado de São Paulo, *Summa Phytopathologica*, v.35, n.2, p. 93-97, 2009.

RAMALHO, M.A.P.; SANTOS, J.B.; ZIMMERMANN, M.J.O. *Genética quantitativa em plantas autógamas: Aplicação ao melhoramento do feijoeiro*. Goiânia, Editora da UFG, 1993. 271 p.

RAMALHO, M.A.P.R.; SANTOS, J.B.; PINTO, C.A.B.P.; SOUZA, E.A.; GONÇALVES, F.M.A.; PINTO, J.C.S.B.P. Genética na agropecuária. Lavras: Editora UFLA, 5 ed, 565 p, 2012.

SANTOS, F.R.C.; ZUCCHI, M.I.; PARK, J.W. et al. New Sugarcane Microsatellites and Target Region Amplification Polymorphism Primers Designed from Candidate Genes Related to Disease Resistance. *Sugar Tech*, p.1-6, jun. 2016.

SCHAKER, P.D.C.; PALHARES, A.C.; TANIGUTI, L.M. et al. RNAseq Transcriptional Profiling following Whip Development in Sugarcane Smut Disease. *Plos One*, v. 11, n. 9, p.1-21, set. 2016.

SCHOTTERER, C. The evolution of molecular markers – just a matter of fashion? *Nature Reviews Genetics*, v. 5, p.63-69, 2004.

SELVI A.; NAIR N.V.; NOYER J.L.; SINGH N.K., BALASUNDARAM N.; BANSAL K.C., KOUNDAL K.R.; MOHAPATRA T. AFLP analysis of the phonetic organization and genetic diversity in the sugarcane complex, *Saccharum* and *Erianthus*. *Genetic Resources and Crop Evolution* 53: 831– 842, 2006.

SELVI, A.; MUKUNTHAN, N.; SHANTHI, R.M.; GOVINDARAJ, P. et al. Assessment of genetic relationships and marker identification in sugarcane cultivars with different levels of top borer resistance. *Sugar Tech*, v. 10, n. 1, p.53-59, 2008.

SINGH, N.; SOMAI, B. M.; PILLAY, D. Molecular profiling demonstrates limited diversity amongst geographically separate strains of *Ustilago scitaminea*. *Fems Microbiology Letters*, v. 247, n. 1, p.7-15, 2005.

SOUZA F.M.; GRANGEIRO M.G.A.; FUENTES M.F.F.; FREITAS E.R.; ESPÍNDOLA G.B. Inclusão da levedura de cana-de-açúcar (*Saccharomyces cerevisiae*) em dietas para frangos de corte. *Revista Brasileira de Zootecnia* 30: 766-773, 2001.

SUNDAR, A.R.; BARNABAS, E.L.; MALATHI, P.; VISWANATHAN, R. A Mini-Review on Smut Disease of Sugarcane Caused by *Sporisorium scitamineum*. In: MWORIA, J.K. *Botany*, cap. 5, p. 107-128, 2012.

TANIGUTI, L.M.; SCHAKER, P.D.C.; BENEVENUTO, J.; PETERS, L.P. et al. Complete Genome Sequence of *Sporisorium scitamineum* and Biotrophic Interaction Transcriptome with Sugarcane. *PlosOne*, v. 10, p.1-31, 2015.

TOKESHI, H. Doenças de cana-de-açúcar (híbridos de *Saccharum spp.*) In: KIMATH, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. *Manual de Fitopatologia*. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, v. 2, p. 207-225, 1997.

UNICA – UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR. Disponível em:< <http://www.unicadata.com.br/listagem.php?idMn=63> >. Acesso em: 16 de junho de 2016 às 14:30h.

VOORRIPS, R.E. MapChart: software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs. *Journal of Heredity*, v. 93, p. 77-78, 2002.

WALLER, J.M. Sugarcane smut (*Ustilago scitaminea*) in Kenya: infection and resistance. *Transactions of the British Mycological Society*, v. 54, n. 3, p. 405-414. 1970.

WEI, X.; JACKSON, P.A.; MCINTYRE, C.L.; AITKEN, K.S.; CROFT, B. Associations between DNA markers and resistance to diseases in sugarcane and effects of population substructure. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 114, p. 155-164, 2006.

WU, K.K.; HEINZ, D.J.; MAYER, H.K. Heritability of sugarcane smut resistance and correlation between smut grade and yield components. *Crop Science*, v. 23, p. 54-56, 1983.

WU, K.K.; HEINZ, D.J.; HOGARTH, D.M. Association and heritability of sugarcane smut resistance to races A and B in Hawaii. *Theoretical Population Biology*, v. 75, p. 754-760, 1988.

WU, R.; MA, C.X.; PAINTER, I.; ZENG, Z.B. Simultaneous maximum likelihood estimation of linkage and linkage phases in outcrossing species. *Theoretical Population Biology*, v. 61, p. 349-363, 2002.

YI, C.; PARK, S.; YUN, H.S.; KWON, C. Vesicle-associated membrane proteins 721 and 722 are required for unimpeded growth of Arabidopsis under ABA application. *Journal Of Plant Physiology*, v. 170, n. 5, p.529-533, mar. 2013.

ZENG, Z.B. Precision Mapping of Quantitative Trait Loci. *Genetics*, v. 136, p. 1457-1468, 1994.

ZHANG, Y.Y.; HUANG, N.; XIAO, X.H.; HUANG, L. et al. Molecular variation of *Sporisorium scitamineum* in Mainland China revealed by internal transcribed spacers. *Genetics And Molecular Research*, v. 14, n. 3, p.7894-7909, 2015.

ZHAO, D.; LI, Y. Climate Change and Sugarcane Production: Potential Impact and Mitigation Strategies *International Journal of Agronomy*, v. 2015, p.1-10, set. 2015.

ZHOU, R.; WU, Z.; JIANG, F.L.; LIANG, M. Comparison of gSSR and EST-SSR markers for analyzing genetic variability among tomato cultivars (*Solanum lycopersicum L.*). *Genetics and Molecular Research*, v. 14, n. 4, p. 13184-13194, 2015.