

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA
FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR, CITOGENÉTICA E
FENOTÍPICA DE ACESSOS DO “COMPLEXO Saccharum”
PARA FINS DE INTROGRESSÃO GENÉTICA**

Maria Natália Guindalini Melloni

Bióloga

2014

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA
FILHO”**

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR, CITOGENÉTICA E
FENOTÍPICA DE ACESSOS DO “COMPLEXO Saccharum”
PARA FINS DE INTROGRESSÃO GENÉTICA**

Maria Natália Guindalini Melloni

Orientador: Profa. Dra. Luciana Rossini Pinto

**Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de
Jaboticabal, como parte das exigências para a
obtenção do título de Doutor em Agronomia
(Genética e Melhoramento de Plantas)**

2014

M527c Melloni, Maria Natália Guindalini
Caracterização molecular, citogenética e fenotípica de acessos do "Complexo Saccharum" para fins de introgressão genética. / Maria Natália Guindalini Melloni. -- Jaboticabal, 2014
xiv, 134 p. : il. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2014
Orientador: Luciana Rossini Pinto
Banca examinadora: Dilermando Perecin, Vitor Fernandes Oliveira de Miranda, Luciana Aparecida Carlini Garcia, Mauro Alexandre Xavier

Bibliografia

1. Cana-de-açúcar. 2. Componentes de produção. 3. Cromossomos. 4. Híbridos. 5. Marcador molecular. 6. Atributos tecnológicos I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 633.61:601.4

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CAMPUS DE JABOTICABAL

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS DE JABOTICABAL

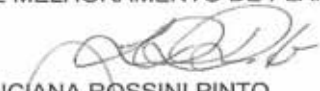
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR, CITOGENÉTICA E FENOTÍPICA DE ACESSOS DO "COMPLEXO Saccharum" PARA FINS DE INTROGRESSÃO GENÉTICA


AUTORA: MARIA NATÁLIA GUINDALINI MELLONI

ORIENTADORA: Profa. Dra. LUCIANA ROSSINI PINTO


Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR EM AGRONOMIA (GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS) , pela Comissão Examinadora:


Profa. Dra. LUCIANA ROSSINI PINTO
Instituto Agronômico de Campinas / Ribeirão Preto/SP


Prof. Dr. MAURO ALEXANDRE XAVIER
Instituto Agronômico de Campinas / Ribeirão Preto/SP


Profa. Dra. LUCIANA APARECIDA CARLINI GARCIA
Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios / Piracicaba/SP


Prof. Dr. DILERMANDO PERECIN
Departamento de Ciências Exatas / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal


Prof. Dr. VITOR FERNANDES OLIVEIRA DE MIRANDA
Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Data da realização: 17 de dezembro de 2014.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

MARIA NATÁLIA GUINDALINI MELLONI – nascida em 29 de junho de 1984, Sertãozinho (SP), Brasil, graduou-se nos anos de 2007 e 2008 em licenciatura e bacharelado em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Campus de Jaboticabal. Em 2008, ingressou nesta mesma Universidade no curso de Mestrado em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas), desenvolvendo trabalhos na área de citogenética de espécies arbóreas, sendo bolsista CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) durante o curso. Em 2011, ingressou no curso de Doutorado em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas), pela mesma instituição sendo bolsista CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e Fapesp (Fundação e Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo). De outubro a março de 2013 e 2014 realizou parte dos seus estudos com citogenética molecular na Universidade de Leicester, na Inglaterra, Reino Unido tendo como supervisor o Dr. John Seymour (Pat) Heslop-Harrison sendo financiada pelo Programa INCT - Ciência sem Fronteiras/CNPQ.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar.
Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”

Madre Tereza de Calcutá

“Dedico aos meus pais Dulce e Milton que são hoje a minha maior definição de amor na terra. E aos meus irmãos Letícia e Felício que são as minhas asas quando não consigo mais andar”

AGRADECIMENTOS

À Deus que de forma maravilhosa me deu uma vida cercada de oportunidades e de pessoas especiais.

À Nossa Senhora e a todos os santos que intercederam junto ao Pai nos momentos de dificuldades durante essa trajetória.

À minha família: meu pai e minha mãe que não pouparam esforços para minha realização profissional se dedicando diariamente e exaustivamente para manterem em mim o ideal da pesquisa e do trabalho honesto. Por apoiar meus planos e por muitas vezes superarem seus próprios limites para a minha felicidade - vocês são meu porto mais seguro, meu melhor sorriso e a parte mais pura de todo meu amor.

À minha irmã Maria Letícia que é a minha grande incentivadora, pessoa capaz de fazer inúmeros sacrifícios para ajudar e aliviar os meus problemas, um anjo na forma de gente, parceira na vida pessoal e acadêmica com quem eu sempre pude contar tanto nas discussões sobre cana-de-açúcar quanto no companheirismo do dia-a-dia, sem ela essa tese seria impossível.

Ao meu irmão Felício que sempre esteve ao meu lado me proporcionando muitos momentos de descontração e me salvando sempre que o meu computador teimava em não trabalhar.

À minha avó, tios, tias e primos (cujos nomes não caberiam neste parágrafo) que sempre estiveram ao meu lado me apoiando das mais diferentes maneiras.

À Dra. Luciana Rossini Pinto, minha orientadora - grande exemplo de pesquisadora - pelos inúmeros ensinamentos, pela paciência, pela reciprocidade, pelos momentos de conforto durante minhas fases de estresse, pela disponibilidade, pelo carinho, amor e consideração a mim dispensado e acima de tudo por confiar, apoiar e me fortalecer constantemente na vida acadêmica.

Ao Instituto Agronômico de Campinas, em especial ao Centro de Cana e a toda equipe do Programa Cana, principalmente ao Dr. Marcos Guimarães de Andrade Landell e ao Dr. Mauro A. Xavier, pela cooperação, pela confiança, pelo apoio intelectual, estrutural, operacional e financeiro.

À Dra. Silvana Creste, por confiar em mim e em meu trabalho, por não medir esforços para impulsionar minha carreira acadêmica e por todos os aconselhamentos nas áreas pessoal e acadêmica.

Aos funcionários: Hector, Rômulo, Roberto, Thiago, Oséias e todos os demais que me acompanharam durante o plantio e biometria dos experimentos.

À equipe (família) da biotecnologia, que fez e faz os meus dias mais alegres e sábios. Graças a amizade de vocês sou uma pessoa melhor e mais amada. Todos colaboraram de forma efetiva e constante na realização dessa tese. Débora (Ilumina), Camila, Cibele Nathaliane, Livia (Ruiva), Brunas (Bruninha Souza e Bruna Turcato), Iza, Rafa, “Carols” (Carol Pani e Carol Mãe), João, Ale (Truta), Paula, Michael (Mi), Mariana, Alisson, Silvan, Marcel, Luiz e em especial ao Maicon (Maicão) por não só aguentar as minhas brincadeiras mas por não medir esforços em ajudar nos trabalhos de campo e nas extrações de DNA, a Jú Borges e a Thaís pelo apoio nas corridas de gel do Licor, a Larissa (Lariss) por todo apoio, ajuda e paciência nas minhas dúvidas citogenéticas, a Fernanda (Fer) que sempre se mostrou disposta a me ajudar nas correções, discussões e referências bibliográficas dos artigos e da própria tese e a Carol Love por todo companheirismo, bons papos e “almoços”.

Ao Professor Pat Heslop-Harrison, a Dra. Trude Schwarzacher, ao Dr. John Bailey e a todos os integrantes do lab 201 da Universidade de Leicester pela oportunidade, pelos ensinamentos na área da citogenética molecular, pela chance de vivenciar diferentes culturas e pelo crescimento pessoal durante o período de doutorado-sanduiche.

Aos meus grandes amigos Grasiela Pinho, Duane da Fonseca, Marina (Marinoca) e Lucia Pinon – pessoas especiais - por me ensinarem que o coração aberto é virtude de poucos mas é capaz de criar laços que duram pela vida inteira, por me aturarem e me introduzirem na família. A vocês meu incondicional e incessável obrigado.

À todos os professores da FCAV – Unesp – Jaboticabal, especialmente aos membros das bancas de qualificação e de doutoramento.

Aos professores Dr. Dilermando Perecin, Dr. Vitor Fernandes Oliveira de Miranda, Dra. Luciana Aparecida Carlini Garcia e Dr. Mauro Alexandre Xavier pela

análise, sugestões e comentários que colaboraram de forma efetiva na finalização da tese.

À todos os funcionários da FCAV – Unesp – Jaboticabal, principalmente aqueles que marcaram toda a minha vida acadêmica como Marcia Fiorese Mataqueiro e Wilson.

À FCAV – Unesp – Jaboticabal por me tornar uma profissional capacitada ensinando acima de tudo o respeito, o amor e a dedicação a profissão que escolhi.

À FAPESP (Processo: 2012/15281-2 e Processo n° 2008/57908-6) e a CAPES por colaborarem de forma efetiva com o financiamento das pesquisas realizadas nesta tese.

Ao INCT e ao CNPq (Projeto INCT/Bioetanol-CNPq n° 574002/2008-1) pelo apoio nacional e internacional na realização do doutorado-sanduiche.

Aos alunos e amigos do curso de pós-graduação em Agronomia -Genética e Melhoramento de plantas.

E a todos aqueles que direta ou indiretamente colaboraram para a realização de mais um sonho.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO -	iv
ABSTRACT-.....	v
CAPITULO 1- CONSIDERAÇÕES GERAIS	1
Introdução	1
Revisão de Literatura	3
A cana-de-açúcar e o Complexo Saccharum	3
Marcadores moleculares do tipo microssatélites	7
Citogenética	8
Caracterização fenotípica	10
Referências Bibliográficas.....	12
CAPÍTULO 2 – CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS ACESSOS DO COMPLEXO SACCHARUM	20
Introdução	20
Genótipos.....	22
Extração de DNA	24
Amplificação dos locos de microssatélites (SSRs)	24
Separação dos fragmentos amplificados	24
Análise de dados	25
Resultados e Discussão.....	26
Conclusões	39
Referências bibliográficas	39
CAPÍTULO 3 – CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DOS ACESSOS DO COMPLEXO SACCHARUM	47
Introdução	48

Material e Métodos.....	50
Genótipos	50
Delineamento experimental	51
Caracterização morfológica	51
Atributos de qualidade e de produção	51
Análise de agrupamento e componentes principais	52
Resultados e Discussão.....	54
Caracterização morfológica	54
Atributos de qualidade e de produção	55
Seleção de modelos para a análise de agrupamento e dos componentes principais.....	61
Análise de agrupamento	63
Componentes principais	65
Referências Bibliográficas.....	70
APENDICE 1	75
CAPÍTULO 4 - TESTE DE DIFERENTES ANTIMITÓTICOS EM PREPARAÇÕES CITOLÓGICAS DE METÁFASES MITÓTICAS DE ESPÉCIES DO GÊNERO <i>SACCHARUM</i>	89
Introdução	89
Material e Métodos.....	91
Resultados e Discussão.....	93
Conclusões	100
Referências Bibliográficas.....	100
CAPÍTULO 5 – CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA DE ACESSOS DO COMPLEXO <i>SACCHARUM</i>	103
Introdução	103
Material e métodos.....	104

Resultados e Discussão.....	106
Conclusões	110
Referências Bibliográficas.....	110
CAPÍTULO 6 – CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E CITOGENÉTICA DE HÍBRIDOS INTERESPECÍFICOS (<i>S. OFFICINARUM</i> X <i>S. SPONTANEUM</i> X <i>SACCHARUM SPONTANEUM</i>) PARA A INTROGRESSÃO	
Introdução	114
Material e métodos.....	115
Análise molecular	115
Citogenética Molecular	116
Resultados e discussão	118
Conclusões	131
Referências Bibliográficas.....	131

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR, CITOGENÉTICA E FENOTÍPICA DE ACESSOS DO “COMPLEXO *Saccharum*” PARA FINS DE INTROGRESSÃO GENÉTICA

RESUMO - A demanda crescente pelo etanol combustível como fonte de energia renovável traz uma série de novos desafios aos programas de melhoramento, uma vez que, atrelado ao aumento da produtividade será necessário o desenvolvimento de novos cultivares de cana-de-açúcar com maior produção de biomassa para sua utilização na produção de energia elétrica e etanol celulósico ou de segunda geração. A incorporação de germoplasma selvagem, como fontes de genes relacionados à fibra, perfilhamento, entre outros, constitui uma das estratégias para promover aumentos significativos de biomassa. Diante deste fato, é de suma importância a caracterização do germoplasma básico, constituído pelos acessos selvagens de cana-de-açúcar (Complexo *Saccharum*) para a sua utilização como genitores em cruzamentos. O trabalho em questão teve como objetivo a caracterização agrônômica, citogenética e molecular de acessos do Complexo *Saccharum*. Para tanto, foram avaliados os atributos de produção e de qualidade de acessos selvagens de cana, bem como, a magnitude da diversidade genética obtida por marcadores do tipo microssatélites destes acessos e de cultivares comerciais de interesse a serem utilizados no processo de introgressão genética. Paralelamente, foram caracterizados por meio da técnica de citogenética, acessos de cultivares comerciais, citótipos de *S.spontaneum* e híbridos de indivíduos selecionados de famílias oriundas de cruzamentos entre cultivares comerciais e acessos selvagens. Os resultados aqui obtidos darão suporte ao Programa de Introgressão Genética do Programa de Melhoramento de Cana-de-Açúcar do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), para desenvolvimento de cultivares com níveis maiores de biomassa.

Palavras-chave: cana-de-açúcar, componentes de produção, cromossomos, híbridos, marcador molecular, atributos tecnológicos

MOLECULAR, CYTOGENETIC AND PHENOTYPIC CHARACTERIZATION OF ACCESSIONS FROM THE “*Saccharum* COMPLEX” FOR GENETIC INTROGRESSION

ABSTRACT- The growing demand for ethanol fuel as a renewable source of energy brings several new challenges to the breeding programs, since aside to the productivity increase there is a need to develop new sugarcane cultivars with high biomass production to be used in electricity production and cellulosic ethanol from second generation. The introduction of wild germplasm as a source of new genes for fiber, tillering among others constitutes one of the strategies to promote significant increases in biomass. Therefore, it is of imperative importance to characterize the basic germplasm composed by sugarcane wild accessions focusing on their use as parents in crosses. This project had as objective the characterization at the agronomic, cytogenetic and molecular level of accessions from the *Saccharum* Complex. The biometric and quality attributes of the wild accessions were evaluate at field experiments. The magnitude of the genetic variability of the wild accessions and commercial cultivars used as parents in the IAC genetic introgression program were obtain through microsatellite molecular markers. In addition, commercial varieties, cytotypes of *S.spontaneum* and hybrids selected from families derived from crosses between cultivars and wild accessions were characterizing by cytogenetic techniques. The obtained results will give support to the Genetic Introgression Program from the IAC Sugarcane Breeding Program in the development of high biomass cultivars.

Keywords: chromosome, hybrid, molecular marker, sugarcane, production components, technological attributes.

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR, CITOGENÉTICA E FENOTÍPICA DE ACESSOS DO COMPLEXO *Saccharum* PARA FINS DE INTROGRESSÃO GENÉTICA

Capítulo 1- Considerações gerais

Introdução

A cana-de-açúcar pertence ao gênero *Saccharum*. Esse gênero, que agrupa diferentes espécies, juntamente com outros correlacionados formam um agrupamento maior denominado Complexo *Saccharum*. Esse complexo reúne os gêneros *Erianthus*, *Sclerostachya*, *Miscanthus* e *Narenga* que são filogeneticamente próximos a *Saccharum* e capazes de se intercruzarem entre si (DANIELS et al., 1975, MUKERJEE, 1957). Devido à grande diversidade existente entre os diferentes acessos desse agrupamento, atualmente os programas de melhoramento genético têm buscado, no complexo, genes relacionados à resistência a estresses bióticos e abióticos bem como fontes de fibra, biomassa e sacarose.

Estudos moleculares, fenotípicos e citogenéticos são importantes fontes de informação para os melhoristas de cana, uma vez que permitem acessar e compreender a variabilidade existente no Complexo *Saccharum*. De acordo com Lanza, Guimaraes e Schuster (2000) os marcadores moleculares auxiliam de forma significativa o melhoramento genético de diversas espécies. Isso porque são capazes de fornecer um número muito grande de polimorfismos em nível do DNA, permitindo a identificação correta de indivíduos e a seleção de acessos que possam gerar combinação de alelos favoráveis. Para Brammer (2000) os usos de marcadores moleculares facilitam os trabalhos dos melhoristas uma vez que permitem a seleção e a realização de novos cruzamentos, inclusive em uma mesma geração, aumentando a eficiência e a rapidez na obtenção de diversas cultivares pelos programas de melhoramento genético. Marcadores moleculares também são de grande valia em estudos relacionados a: seleção de híbridos, identificação de indivíduos (MELLONI et. al., 2014; PAN et al., 2006), desenvolvimento de mapas genéticos (OLIVEIRA et al., 2007), cálculo da taxa de autofecundação (MELLONI et. al., 2014), entre outros.

Caracterizações fenotípicas baseadas em parâmetros de qualidade e componentes de produção permitem a classificação de acessos estudados de acordo com as características de interesse dos melhoristas, bem como favorecem o entendimento do comportamento dos genótipos de interesse em campo. Por meio desses estudos é possível observar quais fenótipos se destacam de acordo com uma ou mais características, gerando informações que aliadas a estudos de heterose, combinações gênicas e complementariedade entre genitores levariam a sugestão de acessos para cruzamentos objetivando novos materiais comerciais. As informações relacionadas a caracterização fenotípica feita a campo também favorecem a manutenção dos bancos de germoplasma de cana-de-açúcar. Isso porque, é possível, por meio dessa análise diferenciar acessos suscetíveis a doenças, a estresse bióticos e abióticos, etc, permitindo a realização de procedimentos ideais, como por exemplo aplicação de adubos, pesticidas, maior irrigação, para a manutenção *ex situ* desses acessos.

Aliado a estudos de caracterização fenotípica e molecular, a citogenética pode agregar informações importantes relacionadas ao entendimento do complemento cromossômico dos acessos do Complexo *Saccharum*. Estudos citogenéticos permitem uma visão única do genoma da espécie em blocos individualizados (cromossomos) facilitando a compreensão do comportamento desses durante a meiose e a mitose (GUERRA; SOUZA, 2002). Além disso, possibilitam a identificação de bandas cromossômicas na obtenção de mapas físicos, estudo de frequências de recombinação entre genomas homólogos e homeólogos, a quantificação física de transgenes, a participação de diferentes genomas na formação de híbridos, etc (, BRAMER et al., 2007; FERRARI, 2010).

A caracterização de acessos do Complexo *Saccharum* por meio de estudos fenotípicos, moleculares e citogenéticos possibilita melhor compreender as relações existentes entre os diversos acessos de cana-de-açúcar, gerando informações importantes para o melhoramento genético da espécie e para a manutenção de bancos de germoplasma.

Neste contexto, o projeto tem como objetivo geral a caracterização agrônômica, citogenética e molecular de acessos do Complexo *Saccharum* para a sua futura utilização em programas de introgressão genética visando o desenvolvimento de

cultivares de cana-de-açúcar com níveis mais elevados de biomassa. Os objetivos específicos são:

- Caracterizar com marcadores do tipo microssatélites acessos selvagens dos gêneros *Saccharum* e *Erianthus*, de interesse potencial para serem utilizados no programa de introgressão;
- Investigar a presença de citótipos nos acessos de *S. spontaneum* disponíveis na Coleção de Germoplasma do Centro de Cana (IAC/APTA) assim como identificar os números cromossômicos dos cultivares/clones envolvidos em cruzamentos entre cultivares comerciais e acessos selvagens;
- Avaliar os atributos de produção e de qualidade tecnológicas dos acessos selvagens.
- Com o uso de marcadores moleculares do tipo microssatélites e por meio da citogenética molecular, confirmar a natureza “híbrida” dos indivíduos selecionados de famílias oriundas de cruzamentos entre cultivares comerciais e os acessos selvagens pelo uso de marcadores moleculares

Revisão de Literatura

A cana-de-açúcar e o Complexo Saccharum

Conhecida pelo seu potencial energético, a cana-de-açúcar tem hoje produção mais significativa que muitos alimentos como o arroz, milho e trigo, superando também a produção de açúcar de beterraba no mundo (HENRY; KOLE, 2010). Caracterizada como uma planta perene, herbácea e alógama, típica de climas tropicais e subtropicais essa planta C4 tem alta eficiência fotossintética em altas temperaturas acumulando em seus colmos principalmente fibra (13%), sacarose (12%) e água (70%) (TEW; COBILL, 2008).

A cana-de-açúcar é nativa do sudeste da Ásia sendo a Índia, Polinésia e Nova Guiné os prováveis centros de origem. A expansão da cultura ocorreu por introdução de acessos cultivados, inicialmente no Golfo de Bengala, sendo distribuída para o Mundo pelos povos da Pérsia, China e Árabes (FIGUEIREDO, 2008).

Classificada como membro da família Poaceae, tribo Andropogoneae e gênero *Saccharum* (DANIELS; ROACH, 1987) os acessos antigos de cana-de-açúcar já

foram inúmeras vezes classificados e reclassificados (DANIELS; ROACH, 1987; IRVINE, 1999; NAIDU; SREENIVASAN, 1987). Atualmente o gênero é constituído por 6 espécies, sendo que os acessos *S. spontaneum* e *S. robustum* que são encontrados crescendo de forma selvagem na Ásia e Indonésia, os acessos de *S. officinarum*, planta conhecida pela sua importante participação na produção comercial dos séculos passados, *S. barberi* e *S. sinense*, acessos antigos da Ásia e *S. edule*, que tem uma inflorescência abortiva utilizada na alimentação (IRVINE, 1999).

A espécie selvagem *S. spontaneum* é capaz de habitar regiões com características contrastantes, suportando ampla variação de temperatura, umidade e tipo de solo (OLIVEIRA, 2006). Essa espécie, que contém colmos finos, ricos em fibras e com baixo teor de sacarose, é considerada resistente a muitas pragas e doenças, tendo elevada capacidade de rebrota de soqueira e surpreendente vigor (AUSTRALIAN GOVERNMENT, 2008, FERRARI, 2010). Ainda, com grande produção de perfilhos, essa espécie possui colmos eretos podendo ter porte baixo ou atingir cerca de 2,5 metros de altura. O número cromossômico da espécie varia de $2n=40-128$ cromossomos com número básico $n=8$ (D'HONT et al., 2008; HA et al., 1999).

A espécie *S. robustum* possui dois números cromossômicos, $2n=80$ e $2n=60$ cromossomos, e tem número básico de $n=10$ cromossomos (PIPERIDIS et al., 2010). Essa espécie tem porte alto, diâmetro espesso, folhas largas e vigorosas (JORDÃO JUNIOR, 2009). Seus colmos fibrosos são pobres em sacarose. Acredita-se que tenha pouca contribuição nos híbridos atuais exceto nos havaianos (SCARPARI; BEUACLAIR, 2008).

S. sinense ($2n=116-120$) e *S. barberi* ($2n=81-124$) são espécies semelhantes morfológicamente, com colmos finos, baixa concentração de sacarose, alta quantidade de fibra e tolerante aos estresses biótico e abiótico (PIPERIDIS et al., 2010). De acordo com D'Hont (2005) essas espécies são frutos de hibridações entre *S. spontaneum* e *S. officinarum* sendo improvável a participação de uma terceira espécie no genoma desses materiais. Segundo a autora, a maior parte do genoma dessas espécies tem cromossomos oriundos de *S. officinarum*.

A espécie *S. edule* tem pouca utilidade nos programas de melhoramento, uma vez que suas inflorescências são abortivas o que impede a formação de híbridos (IRVINE, 1999). Acessos de *S. edule* são utilizados na alimentação humana na Nova

Guiné que é considerada um dos centros de origem dessa espécie (SCARPARI; BEUACLAIR, 2008). São encontrados para esse material exemplares com número cromossômico de $2n = 60, 70$ ou 80 cromossomos (ROACH, 1972).

Saccharum officinarum é considerada a espécie com maior Brix entre todas as pertencentes ao gênero (IRVINE, 1999). Conhecida como cana nobre, estes materiais têm alto teor de sacarose e pequena quantidade de fibra (AUSTRALIAN GOVERNMENT, 2008). Segundo Price (1963), apresenta número cromossômico único de $2n=80$ cromossomos. Seu número básico é $n=10$ cromossomos de acordo com D'Hont (2005). Por ser altamente susceptível a diversas doenças, como por exemplo o mosaico, as nações produtoras de *S. officinarum* iniciaram neste acesso uma série de hibridações com outras espécies do mesmo gênero (SCARPARI; BEUACLAIR, 2008).

As cultivares atuais são híbridos complexos, surgidos a partir das primeiras hibridações entre *S. officinarum* e *S. spontaneum* (D'HONT et al., 1998, IRVINE, 1999). Estes híbridos apresentam número cromossômico variando de $2n=100-130$ cromossomos (D'HONT et al., 1996; PIPERIDIS et al., 2000). Com o objetivo de aumentar o conteúdo de açúcar e resistência a estresses bióticos e abióticos, acessos de *S. officinarum* foram cruzados com acessos de *S. spontaneum*, os híbridos oriundos desse processo foram então por várias vezes retrocruzados com *S. officinarum*. Durante essas hibridações a não ocorrência de reduções cromossômicas no processo de meiose, ao longo de gerações não sequenciais, fez com que os acessos originados desses retrocruzamentos passassem a possuir maior conteúdo genético de *S. officinarum* em comparação com *S. spontaneum*. Esses processos de retrocruzamentos de híbridos com *S. officinarum* (conhecida como “cana nobre”) recebeu o nome de nobilização (DINARDO-MIRANDA et al., 2008).

O gênero *Saccharum* unido a outros gêneros proximamente relacionados formam um agrupamento maior chamado Complexo *Saccharum* (DANIELS et al., 1975). Apesar deste termo taxonômico ser considerado informal, ele ainda é usado atualmente para designar essa reunião de espécies. O termo Complexo *Saccharum* foi definido por Mukherjee em 1957, a partir da análise de dados fitogeográficos, morfológicos, citológicos e de hibridação, os quais indicaram que os gêneros *Saccharum*, *Erianthus* (seção *Ripidium*), *Sclerostachya* e *Narenga* poderiam ser

agrupados em um complexo de espécies. Em 1975, Daniels e seus colaboradores revisaram os trabalhos de Mukherjee e incluíram o gênero *Miscanthus*, seção *Diandra* a este grupo. Esse complexo apresenta diversidade de espécies e é uma importante fonte de variabilidade genética.

Entre os membros pertencentes a esse complexo, o gênero *Erianthus*, seção *Ripidium* é considerado uma das mais relevantes fontes de fibra. Acessos de *Erianthus* são conhecidos por serem detentores de biomassa, apresentando resistência a pragas e doenças, sendo, por isso, utilizados no melhoramento genético de cana (NAIR; PRANEETHA, 2006; PIPERIDIS et al., 2000). Com espécies cujo os exemplares variam de 5 a 7 m, esses acessos possuem colmos finos com cerca de 15 cm de diâmetro se diferenciando do gênero *Saccharum*, principalmente pela ausência de bainha, lígula e aurícula no colar (JORDÃO JUNIOR, 2009). Espécies como *E. fulvus* e *E. arundinaceus* tem sido utilizadas em cruzamentos com genótipos do gênero *Saccharum* com o objetivo de aumentar o teor de biomassa dos híbridos (D'HONT et al., 1995; ZHANG et al., 2009).

A seção *Diandra* do gênero *Miscanthus*, traz características agrônômicas promissoras ao melhoramento da cana, entre elas a alto teor ligno-celulósica que pode ser usado para vários fins, como a produção de energia e fibras (JONES; WALSH, 2001). De acordo com Lewandowski et al. (2000), o gênero *Miscanthus* tem suas origens em regiões tropicais e subtropicais, sendo encontradas algumas de suas espécies também na Ásia Oriental. Dessa forma, esse gênero apresenta alta capacidade de adaptação a variações ambientais, difundindo-se por diversas partes do globo. Esta planta tem baixa exigência em relação a nutrientes, energia e água apresentando-se, portanto, como uma espécie alternativa para o sequestro de carbono (JONES; WALSH, 2001). De acordo com Jordão Junior (2009), o gênero *Miscanthus* que é composto por catorze espécies e foi difundido por toda Europa, sendo algumas espécies utilizadas como plantas ornamentais.

As espécies do gênero *Sclerostachya* têm abundante perfilhamento e resistência a solos encharcados (SREENIVASAN; SREENIVASAN, 1984). De acordo com Janaki Ammal (1940), espécies como *Sclerostachya fusca* tem hábito semelhante a *Saccharum spontaneum* distinguindo-se dessa última por apresentar perfilhos

menos frágeis e por possuir pedúnculos com espiguetas do sexo feminino, em vez de hermafrodita.

O gênero *Narenga* tem centro de origem no Nepal e na Índia, apresenta alta capacidade de perfilhamento, resistência a diversas doenças, porte ereto e se adapta a diferentes tipos de solo (JAGATHESAN; SREENIVASAN, 1967).

Marcadores moleculares do tipo microssatélites

Estudos moleculares são importantes ferramentas para o melhoramento da cana-de-açúcar. De acordo com Ferreira e Grattapaglia (1998) marcadores moleculares podem ser definidos como todo e qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso, ou de segmento específico do DNA. Esses marcadores são utilizados atualmente nos programas de melhoramento genético de plantas, auxiliando na compreensão da diversidade genética dentro dos bancos de germoplasma, na identificação de acessos duplicados, permitindo ainda a caracterização de cultivares, híbridos ou linhagens e a criação de padrão único (“fingerprinting”) para cada cultivar, facilitando o registro e a proteção de novas cultivares (BROWN et al., 2007; CORDEIRO et al., 2003; CRESTE et al., 2010; DEVARUMATH et al., 2012; XAVIER et al., 2014).

Marcadores moleculares do tipo microssatélite têm apresentado grande destaque nos estudos de cana-de-açúcar no Brasil e no mundo. Conhecidos também pela sigla SSR (“Simple Sequence Repeat”), são constituídos por pequenas sequências de DNA, variando de 1 até 6 nucleotídeos repetidos em tandem, cerca de oito vezes ou mais, sendo essas sequências frequentes e amplamente distribuídas ao acaso no genoma estudado, constituindo, portanto, loci genéticos altamente polimórficos (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). Os microssatélites têm ampla distribuição nos genomas dos vegetais estimando-se uma frequência de um a cada 50 mil pares de bases, sendo o dinucleotídeo AT o elemento mais repetido (MORGANTE; OLIVIERI, 1993). Na cana-de-açúcar, a caracterização por marcadores microssatélites tem sido considerada altamente eficiente devido à sua reprodutibilidade e alto polimorfismo (PINTO et al., 2006), bem como pelo seu papel importante em estabelecer relações genéticas entre os indivíduos. Para Creste et al.

(2010), a utilização de marcadores do tipo SSR permitem a identificação de vários alelos exclusivos a uma cultivar ou clone contribuindo de forma efetiva para entender a diversidade genética dos genótipos estudados. Cordeiro et al. (2003) mencionaram que o uso deste tipo de marcador em cana fornece informações sobre distâncias genéticas, testes de paternidade, pólen contaminante em uma prole, além de colaborar na seleção assistida por marcadores, em casos em que o marcador é associado a uma característica de interesse.

Devido á sua importância no melhoramento e na caracterização de acessos de cana-de-açúcar como já exemplificado acima, estudos com marcadores moleculares têm se tornado cada vez mais necessários (ALMEIDA et al., 2012; MANIGBAS; VILLEGAS, 2004; MCINTYRE et al., 2005; PAN et al.,2006

Citogenética

A citogenética, área das Ciências Biológicas que sobrepõe os conhecimentos oriundos da Citologia e da Genética, tem como objetivo o estudo e a compreensão dos cromossomos. Informações cromossômicas vêm sendo utilizadas na identificação de híbridos, em estudos taxonômicos, sistemáticos e evolutivos e em programas de melhoramento genético (HESLOP-HARRISON, 2000; LEWIS; ELVIN-LEWIS, 1995).

Mesmo diante do advento de novas ferramentas oriundas da Genética Molecular, as análises citogenéticas continuam sendo a única forma de se observar o genoma total de um eucarioto na forma de blocos individualizados de material genético, permitindo a mensuração, a diferenciação em subunidades e a manipulação dos cromossomos (GUERRA, SOUZA; 2002).

A análise cromossômica sempre foi um dos campos estimulantes da Citologia e da Genética, tendo relação entre estudos taxonômicos e evolutivos, bem como no melhoramento genético e na caracterização de germoplasma (BRAMER et al., 2007).

Como variação da citogenética clássica, as técnicas de citogenética molecular tem agregado aos estudos cromossômicos ainda mais efetividade e importância. Uma das mais valiosas técnicas ligadas a citogenética molecular é a realização de hibridização *in situ*, que tem permitido estudos precisos sobre participação genômica de genitores nos cromossomos dos filhos bem como facilitado a criação de mapas

físicos em diferentes vegetais. Essa técnica é baseada no pareamento de determinados segmentos específicos de DNA ou RNA ou DNA genômico com uma sequência complementar no cromossomo, sendo esse evento diretamente ou indiretamente corado por meio de fluorescência (FERRARI, 2010; GUERRA, 2004; SCHWARZACHER; HESLOP-HARRISON, 2000). Essa técnica utiliza marcadores citogenéticos, os quais apresentam expressão independente das variações ambientais ou da ativação gênica, tornando-a muito confiável. Além disso, a detecção desse tipo de sequências de DNA tem originado grandes avanços nos programas de pré-melhoramento e melhoramento genético de espécies colaborando não só com a construção de mapas físicos, mas também na investigação detalhada da estrutura cromossômica, no acompanhamento da quantidade de cromatina introgrida, em cruzamentos entre espécies e na análise de pareamentos intergenômicos em plantas híbridas (BRAMMER et al., 2007; PAGLIARINI; POZZOBON, 2004). Esse procedimento pode ser utilizado também para diferenciar os cromossomos de uma espécie em um híbrido interespecífico ou para distinguir o genoma de um diplóide ancestral em uma espécie de aloploplóide (GUERRA, 2004).

Dentre as variações existentes na prática da hibridização *in situ* as técnicas de FISH (“Fluorescence *in situ* hybridization”) e GISH (“Genomic *in situ* hybridization”), merecem destaque. O processo do FISH utiliza como sonda, sequências únicas ou repetitivas de material genético permitindo a criação de marcadores moleculares cromossômicos que facilitam a comparação cariotípica, fornecendo subsídios à análise e investigação da estrutura, função e evolução dos cromossomos; além de favorecer a observação da localização exata de genes e sequências que promovem a obtenção de mapas físicos vegetais (GUERRA, 2004, ZANELLA, 2009).

A hibridização genômica *in situ* ou GISH é uma variação da FISH. Nessa técnica, o genoma total de um organismo é marcado com o intuito de se conhecer e quantificar os cromossomos de determinada espécie em seu híbrido ou em seu poliplóide (RAINA; RANI, 2001).

Estudos de D’Hont et al. (1995) demonstraram a identificação da natureza híbrida de cruzamentos por meio de citogenética em indivíduos originários do cruzamento de *S. officinarum* e *Erianthus arundinaceus*. D’Hont et al (1996) estudaram por meio da técnica de hibridização *in situ* a participação dos diferentes

genomas de *S. officinarum* e *S. spontaneum* em cultivares atuais e híbridos de *S. officinarum* e *S. spontaneum*. Trabalhos realizados por Cuadrado et al. (2005) também calcularam a participação desses genomas em diferentes cultivares de cana.

Apesar da sua importância econômica mundial, a cana-de-açúcar tem sido relativamente pouco estudado pelos cientistas em termos citogenéticos (D'HONT et al., 1996). Segundo Oliveira (2006) a maioria dos estudos realizados em cana são especulativos em termos de informações de estrutura e organização do genoma, principalmente pelo fato de os cultivares comerciais apresentarem alto nível de poliploidia e genoma aneuplóide.

Por meio das técnicas citogenéticas clássica e molecular, pesquisadores CUADRADO et al., 2005; D'HONT et al., 1996; IRVINE, 1999) têm tentado entender o mecanismo genético-celular da cana-de-açúcar esclarecendo as origens cromossômicas dos genomas híbridos, estabelecendo números básicos e identificando o processo evolutivo das cultivares atuais, ao mesmo tempo, em que propõem estudos filogenéticos das espécies do Complexo *Saccharum*.

De acordo com Guerra (2012) a citogenética se diferencia das demais áreas da Genética por exigir um treinamento técnico longo, sendo os trabalhos relacionados a essa área fortemente artesanal, de maneira que a qualidade dos mesmos é altamente dependente, tanto dos protocolos quanto da habilidade individual do pesquisador.

No entanto, dada a importância das informações obtidas com o uso da citogenética, trabalhos relacionados estudos cromossômicos são cada vez mais necessários e importantes exigindo dos pesquisadores um cuidado especial.

Caracterização fenotípica

Em cana-de-açúcar, os parâmetros de qualidade e componentes de produção são importantes instrumentos para conhecer o comportamento dos materiais em campo.

Os programas de melhoramento genético de cana-de-açúcar avaliam uma quantidade muito grande de características em cada etapa de seleção, tanto morfológicas, quanto fisiológicas e industriais (COSTA et al., 2013).

Atributos como altura, diâmetro de colmo, peso da cana e número de perfilho permitem a diferenciação de acessos, bem como a seleção de caracteres considerados bons para o melhoramento. Entre as principais informações utilizadas nos programas melhoramento da cana-de-açúcar está tonelagem de cana por hectare (TCH). O peso, os números de colmo dos acessos, o diâmetro, a altura e a densidade da touceira são utilizados para o cálculo do TCH (LANDELL; BRESSIANI, 2008; MANCINI, 2010).

De acordo com Vian (2014) o termo “POL” reflete o teor de sacarose aparente contido na cana analisada, sendo que quanto mais elevados os teores de sacarose, maior o interesse da agroindústria sucroalcooleira no cultivar em questão

O Brix se refere a refração da luz no caldo obtido na cana sendo usado comumente para o cálculo de maneira indireta da quantidade de compostos solúveis na amostra, sendo possível encontrar entre esses sólidos a sacarose. De acordo com Leme Filho (2005), esse caracter pode ser estimado por meio de refratômetro ou densidade.

O ATR (Açúcar total recuperável) reflete a quantidade total de açúcares da cana presente na amostra. Para Leme Filho (2005), o cálculo desse carater é feito por meio de uma equação que envolve uma série de variáveis como Pol da cana, açúcares reductores entre outros, sendo o ATR a variável utilizada para se estipular o valor pago aos fornecedores pelos usineiros.

Uma importante característica analisada na cana nos dias atuais é o PBU (Peso do Babaço Úmido). Por meio do PBU é possível realizar o cálculo da fibra da cana. O aumento dessa característica tem atraído a atenção dos melhoristas uma vez que a fibra produzida durante os processos de fabricação de açúcar e álcool pode ser também utilizada como fonte de energia elétrica e de etanol de segunda geração.

Os dados produzidos separadamente pelos componentes de produção e pelos parâmetros de qualidade podem ser considerados conjuntamente por meio da análise multivariada de dados. Este tipo de método estatístico é capaz de analisar de forma simultânea diversas medidas em cada objeto analisado.

Sendo assim, informações fenotípicas relacionadas ao Complexo *Saccharum* podem agregar ainda mais conhecimentos relacionados a caracterização e utilização de acessos nos programas de melhoramento.

Referências Bibliográficas

AUSTRALIAN GOVERNMENT. **The Biology and Ecology of Sugarcane (*Saccharum* spp. hybrids) in Australia.** Disponível em: <[http://www.ogtr.gov.au/internet/ogtr/publishing.nsf/content/sugarcane-3/\\$FILE/biologysugarcane.pdf](http://www.ogtr.gov.au/internet/ogtr/publishing.nsf/content/sugarcane-3/$FILE/biologysugarcane.pdf)>. Acesso em: 12 jan., 2014.

BRAMMER, S. P. **Marcadores moleculares: princípios básicos e uso em programas de melhoramento genético vegetal.** Embrapa Trigo, 2000. 12 p.

BRAMMER, S.; ZANOTTO, M.; CAVERZAN, A. Citogenética vegetal: da era clássica à molecular. **Embrapa Trigo. Documentos Online**, 2007.

BUZACOTT, J.H. Cane varieties and breeding. In :Manual of cane growing, KIM JM, MUNGOMERY RW, HUGHES CG, eds. Sydney,1965, p. 220-253.

CORDEIRO, G. M.; PAN, Y.-B.; HENRY, R. J. Sugarcane microsatellites for the assessment of genetic diversity in sugarcane germplasm. **Plant Science**, v. 165, n. 1, p. 181-189, 2003.

COSTA, K. D. D. S.; CARVALHO, I. D. E. D.; SANTOS, L. D. S.; SANTOS, P. R. D.; SILVA, J. W. D. Seleção de descritores em cana-de-açúcar por meio de componentes principais. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 8, n. 1, p. 207-210, 2013.

CRESTE, S.; SANSOLI, D.; TARDIANI, A.; SILVA, D.; GONÇALVES, F.; FAVERO, T.; MEDEIROS, C.; FESTUCCI, C.; CARLINI-GARCIA, L.; LANDELL, M. Comparison of AFLP, TRAP and SSRs in the estimation of genetic relationships in sugarcane. **Sugar Tech**, v. 12, n. 2, p. 150-154, 2010.

CUADRADO, A.; ACEVEDO, R.; DE LA ESPINA, S. M. D.; JOUVE, N.; DE LA TORRE, C. Genome remodelling in three modern *S. officinarum* × *S. spontaneum* sugarcane cultivars. **Journal of experimental botany**, v. 55, n. 398, p. 847-854, 2004.

D'HONT, A. Unraveling the genome structure of polyploids using FISH and GISH; examples of sugarcane and banana. **Cytogenetic and genome research**, v. 109, n. 1-3, p. 27-33, 2005.

DANIELS, J.; ROACH, B. T. Taxonomy and evolution. **Sugarcane improvement through breeding. Elsevier, Amsterdam**, v. 7, 1987.

DANIELS, J.; SMITH, P.; PATON, N.; WILLIAMS, C. The origin of the genus *Saccharum*. **Sugarcane Breed. Newsl**, v. 36, p. 24-39, 1975.

DE AGUIAR, M. S. MARCADORES MOLECULARES COMO FERRAMENTA NO MELHORAMENTO GENÉTICO DE PLANTAS. **Marcadores moleculares**, p. 10, 2012.

D'HONT, A.; GRIVET, L.; FELDMANN, P.; GLASZMANN, J.; RAO, S.; BERDING, N. Characterisation of the double genome structure of modern sugarcane cultivars (*Saccharum* spp.) by molecular cytogenetics. **Molecular and General Genetics MGG**, v. 250, n. 4, p. 405-413, 1996.

D'HONT, A.; ISON, D.; ALIX, K.; ROUX, C.; GLASZMANN, J. C. Determination of basic chromosome numbers in the genus *Saccharum* by physical mapping of ribosomal RNA genes. **Genome**, v. 41, n. 2, p. 221-225, 1998.

D'HONT, A.; RAO, P.; FELDMANN, P.; GRIVET, L.; ISLAM-FARIDI, N.; TAYLOR, P.; GLASZMANN, J. Identification and characterisation of sugarcane intergeneric hybrids, *Saccharum officinarum* × *Erianthus arundinaceus*, with molecular markers and DNA in situ hybridisation. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 91, n. 2, p. 320-326, 1995.

DINARDO-MIRANDA, L. L.; VASCONCELOS, A. C. M.; LANDELL, M. G. de A. **Cana-de-açúcar**. Campinas: Instituto Agrônômico. 2008.

DOS SANTOS, J. M.; DUARTE FILHO, L. S. C.; SORIANO, M. L.; DA SILVA, P. P.; NASCIMENTO, V. X.; DE SOUZA BARBOSA, G. V.; TODARO, A. R.; RAMALHO NETO, C. E.; ALMEIDA, C. Genetic diversity of the main progenitors of sugarcane from the RIDESA germplasm bank using SSR markers. **Industrial Crops and Products**, v. 40, p. 145-150, 2012.

FERRARI, F. **Caracterização cromossômica em cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*, Poacea)**, 2010, 91 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília:EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220p.

FIGUEIREDO, P. Breve história da cana-de-açúcar e do papel do Instituto Agrônômico no seu estabelecimento no Brasil. IN: DINARDO-MIRANDA, L.L.; DE VASCONCELOS, A.C.M.; LANDELL, M.G.A. . **Cana-de-açúcar**. 1. ed. Campinas: Instituto Agrônômico, 2008, p. 31-44, 2008.

GRIVET, L.; DANIELS, C.; GLASZMANN, J.-C.; D'HONT, A. A review of recent molecular genetics evidence for sugarcane evolution and domestication. 2004.

GUERRA, M. Citogenética molecular: Protocolos comentados. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1ª edição: Editora CUBO.2013, p.1- 34.

GUERRA, M. **FISH: conceitos e aplicações na citogenética**. Sociedade Brasileira de Genética, 2004. p. 1-32.

GUERRA, M.; SOUZA, M. J. **Como observar cromossomos: um guia prático de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana**. Editora Fumpec. 131p., 2002.

HA, S.; MOORE, P. H.; HEINZ, D.; KATO, S.; OHMIDO, N.; FUKUI, K. Quantitative chromosome map of the polyploid *Saccharum spontaneum* by multicolor fluorescence in situ hybridization and imaging methods. **Plant molecular biology**, v. 39, n. 6, p. 1165-1173, 1999.

HENRY, R. J.; KOLE, C. **Genetics, genomics and breeding of sugarcane**. Science Publishers, Inc, 2010.

HESLOP-HARRISON, J. Comparative genome organization in plants: from sequence and markers to chromatin and chromosomes. **The Plant Cell Online**, v. 12, n. 5, p. 617-635, 2000.

HITCHCOCK, A. S. Type species of the first 100 genera of Linnaeus' *Species plantarum*. **American Journal of Botany**, v. 10, n. 9, p. 510-514, 1923.

IRVINE, J. *Saccharum* species as horticultural classes. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 98, n. 2, p. 186-194, 1999.

JAGATHESAN, D.; SREENIVASAN, T. Cytogenetical Studies in *Narenga porphyrocoma*. **Cytologia**, v. 32, n. 1, p. 11-18, 1967.

JANAKI AMMAL, E. K. (1940) Chromosome numbers in *Sclerostachya fusca*. **Nature**, v. 145, n. 3673, p. 464-464, 1940.

JONES, M. B.; WALSH, M. **Miscanthus for energy and fibre**. Earthscan, 334 p., 2001.

JORDÃO JUNIOR, H. **Desenvolvimento de um sistema baseado em marcadores moleculares de DNA do tipo microssatélites para identificação de cultivares de cana-de-açúcar**. Dissertação (Mestrado em Biologia Funcional e Molecular na área

de Bioquímica) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 91 f., 2009.

LANDELL, M. G. A.; BRESSIANI, J. A. Melhoramento genético, caracterização e manejo varietal. . In: DINARDO-MIRANDA, L.L; VASCONCELOS, A. C. M.; LANDELL, M. G. A. (Ed.). **Cana-de-açúcar**. Campinas, Instituto Agrônômico, 2008, p.47-56.

LANZA, M.; GUIMARÃES, C.; SCHUSTER, I. Aplicação de marcadores moleculares no melhoramento genético. **Informe agropecuário**, v. 21, n. 204, 2000.

LEME FILHO, J. R. A. **Estudo comparativo dos métodos de determinação e de estimativa dos teores de fibras e de açúcares redutores em cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*)**. 2005.151f. Dissertação (Mestrado em Ciências –Ciências e tecnologia do alimento) Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” - Universidade de São Paulo, 2005.

LEWANDOWSKI, I.; CLIFTON-BROWN, J.; SCURLOCK, J.; HUISMAN, W. Miscanthus: European experience with a novel energy crop. **Biomass and Bioenergy**, v. 19, n. 4, p. 209-227, 2000.

LEWIS, W. H.; ELVIN-LEWIS, M. P. Medicinal plants as sources of new therapeutics. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, p. 16-24, 1995.

MANCINI, M. C. **Mapeamento genético e identificação de marcadores AFLP, microssatélites genômicos e funcionais associados a parâmetros agroindustriais em cana-de-açúcar**. 2010, 98f. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Área de Concentração em Genética e Melhoramento de Plantas) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

MANIGBAS, N.; VILLEGAS, L. Microsatellite markers in hybridity tests to identify true hybrids of sugarcane. **Philippine Journal of Crop Science**, v. 29, n. 2, p. 23-32, 2004.

MCINTYRE, C.; JACKSON, P. Low level of selfing found in a sample of crosses in Australian sugarcane breeding programs. **Euphytica**, v. 117, n. 3, p. 245-249, 2001.

MORGANTE, M.; OLIVIERI, A. M. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. **The Plant Journal**, East Lansing, v.3, n.1, p.175-182, 1993.

MELLONI, M.; SCARPARI, M.; PINTO, L.; PERECIN, D.; XAVIER, M.; LANDELL, M. Selfing rate estimation in sugarcane under unfavorable natural conditions of crossing by using microsatellite markers. **Genetics and Molecular Research**, v. 13, n. 1, p. 2278, 2014.

MUKHERJEE, S. K. Origin and distribution of *Saccharum*. **Botanical Gazette**, p. 55-61, 1957.

NAIDU, K. M.; SREENIVASAN, T. Conservation of sugarcane germplasm. In: Proceedings of the Copersucar International Sugarcane Breeding Workshop. Copersucar Technology Centre, Piracicaba-SP, Brazil, 1987, p. 33-53

NAIR, N. V.; PRANEETHA, M. Cyto-morphological studies on three *Erianthus arundinaceus* (Retz.) Jeswiet accessions from the Andaman-Nicobar Islands, India. **Cytologia**, v. 71, n. 2, p. 107-109, 2006.

OLIVEIRA, K. M. **Desenvolvimento de marcadores moleculares EST-RSSs e mapeamento funcional em cana-de-açúcar (*Saccharum* ssp.)**. 2006. 165 f. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular – Genética Vegetal e Melhoramento). Universidade Estadual de Campinas- Instituto de Biologia. Campinas, 2006.

PAGLIARINI, M.; POZZOBON, M. II Curso de citogenética aplicada a recursos genéticos vegetais. **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia–DF**, 2004.

PAN, Y.-B.; TEW, T.; SCHNELL, R.; VIATOR, R.; RICHARD, E.; GRISHAM, M.; WHITE, W. Microsatellite DNA marker-assisted selection of *Saccharum spontaneum* cytoplasm-derived germplasm. **Sugar Tech**, v. 8, n. 1, p. 23-29, 2006.

PINTO, L. R.; OLIVEIRA, K. M.; ULIAN, E. C.; GARCIA, A. A. F.; DE SOUZA, A. P. Survey in the sugarcane expressed sequence tag database (SUCEST) for simple sequence repeats. **Genome**, v. 47, n. 5, p. 795-804, 2004.

PIPERIDIS, G.; CHRISTOPHER, M. J.; CARROLL, B. J.; BERDING, N.; D'HONT, A. Molecular contribution to selection of intergeneric hybrids between sugarcane and the wild species *Erianthus arundinaceus*. **Genome**, v. 43, n. 6, p. 1033-1037, 2000.

PIPERIDIS, N.; CHEN, J.-W.; DENG, H.-H.; WANG, L.-P.; JACKSON, P.; PIPERIDIS, G. GISH characterization of *Erianthus arundinaceus* chromosomes in three generations of sugarcane intergeneric hybrids. **Genome**, v. 53, n. 5, p. 331-336, 2010.

PRICE, S. Cytogenetics of modern sugar canes. **Economic Botany**, v. 17, n. 2, p. 97-106, 1963.

RAINA, S.; RANI, V. GISH technology in plant genome research. In: (Ed.). **Chromosome Painting**. Springer, 2001. p.83-104.

ROACH, B.; DANIELS, J. A review of the origin and improvement of sugarcane. In: Copersucar international sugarcane breeding workshop, 1987, p. 1-31.

ROACH, B.T., Chromosome numbers in *Saccharum edule*. **Cytologia**, 1972, v.37, 155-161.

SCARPARI, M.S.; de BEAUCLAIR, E.G.F. Anatomia e Botânica. IN: DINARDO-MIRANDA, L.L.; DE VASCONCELOS, A.C.M.; LANDELL, M.G.A. . **Cana-de-açúcar**. 1. ed. Campinas: Instituto Agronômico, 2008, cap. 2, p.47-56.

SCHWARZACHER, T.; HESLOP-HARRISON, P. **Practical in situ hybridization**. BIOS Scientific Publishers Ltd, 2000.

SREENIVASAN, J.; SREENIVASAN, T. In vitro propagation of a *Saccharum officinarum* (L.) and *Sclerostachya fusca* (Roxb.) A. Camus hybrid. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 67, n. 2-3, p. 171-174, 1984.

TEW, T. L.; COBILL, R. M. Genetic improvement of sugarcane (*Saccharum* spp.) as an energy crop. In: (Ed.). **Genetic improvement of bioenergy crops**. Springer, 2008. p.273-294.

VIAN, C. E.F. **Qualidade de matéria-prima**. Disponível em: http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01_138_22122006154842.html. Acesso em: 12 setembro, 2014.

ZANELLA, L. Caracterização cariotípica de quatro espécies brasileiras de Alstroemeria (alstroemeriaceae) com as técnicas de FISH, CMA, DAPI e AGNOR. 2009. 79 f. Dissertação (Mestrado em Genética, Melhoramento Vegetal e Biotecnologia) – Instituto Agronômico. Campinas.

ZHANG, H.; HE, L.; ZHONG, H.; LI, F.; HE, S.; YANG, Q. Identification of intergeneric hybrids between *Saccharum* spp. and *Erianthus fulvus* with ITSs. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 9, 2009.

CAPÍTULO 2 – Caracterização molecular dos acessos do Complexo *Saccharum*

RESUMO - Os bancos de germoplasma são importantes ferramentas para os programas de melhoramento, pois representam fontes de variabilidade genética que podem ser empregadas em novos cruzamentos. A diversidade e a dissimilaridade genética entre acessos de cana-de-açúcar podem ser caracterizadas por estudos moleculares, os quais contribuem para a identificação de acessos duplicados ou erroneamente classificados e estudos agronômicos auxiliando programas de introgressão gênica de características de interesse, como teor de fibra e biomassa. No presente trabalho, objetivou-se a caracterização por meio do cálculo da diversidade e a dissimilaridade genética, dos acessos do Complexo *Saccharum* e de genitores e clones elites utilizadas em cruzamentos com o uso de marcadores moleculares do tipo microssatélites. Com base nos marcadores moleculares foi possível identificar acessos duplicados e erroneamente identificados, bem como estimar a dissimilaridade ($D = 1 - S$, obtida pelo coeficiente de Jaccard) entre tais genótipos. Acessos de *S. barberi* tiveram dissimilaridade média de 0,43, para acessos de *S. robustum* esse valor foi de 0,60, para os de *S. spontaneum*, 0,65, enquanto para genótipos de *S. officinarum* e híbridos antigos, 0,56 e finalmente entre as cultivares atuais, 0,48. A diversidade genética foi maior dentro das populações do que entre elas. As informações obtidas poderão ser utilizadas na gestão do banco de germoplasma, em programas de introgressão genética, na sugestão de futuros cruzamentos e na manutenção dos bancos de germoplasma.

Palavras-chave: microssatélites, diversidade genética, acessos selvagens, cana-de-açúcar, dissimilaridade.

Introdução

Bancos de germoplasma são de extrema importância para a segurança e manutenção da agricultura mundial. Nessas coleções que abrigam desde cultivares tradicionais e modernos, até espécies selvagens, é possível encontrar diversidade de

materiais genéticos, que podem ser excelentes fontes de genes de interesse para agricultores e melhoristas (RAO, 2004, VILLALOBOS; ENGELMANN, 1995).

Diversos trabalhos na área de genética e melhoramento de plantas têm sido realizados visando conhecer melhor a diversidade existente entre os acessos dos mais diferentes bancos de germoplasma (COTO et al., 2002; DEVARUMATH et al., 2012; DOS SANTOS et al., 2012; NAYAK et al., 2014; RAM et al., 2001; SANTCHURN et al., 2012). Tendo como objetivo a busca por fonte de genes relacionados ao aumento de produção, resistência a doenças e estresses abióticos e bióticos, os estudos moleculares têm auxiliado na manutenção, construção e utilização de bancos de germoplasma (COTO et al., 2002; DEVARUMATH et al., 2012; NAYAK et al., 2014)

Podemos encontrar esses bancos distribuídos em diferentes partes do mundo, merecendo destaques as coleções mundiais localizadas em Miami, nos Estados Unidos (NAYAK et al. 2014; TODD et al., 2014) e em Kerala na Índia (TODD et al., 2014), sendo o Brasil o terceiro país a receber, nos próximos anos, uma cópia desses materiais (ROQUE, 2014). Essas grandes coleções de cana-de-açúcar têm extrema importância na manutenção dessa espécie, devido a base genética estreita e aos poucos acessos envolvidos nos primeiros processos de hibridação interespecífica realizados no passado (BERDING; ROACH 1987; D'HONT et al. 1995). A seleção intensiva para o alto teor de açúcar provocou também uma erosão genética muito grande nessas espécies e nos gêneros correlacionados (COTO et al., 2002; SELVI et al. 2006).

Pertencente ao gênero *Saccharum* (composto por *S. officinarum*, *S. barberi*, *S. sinense*, *S. robustum*, *S. edule* e *S. spontaneum*), a cana-de-açúcar forma com outros gêneros estreitamente relacionados, a saber *Erianthus*, *Narenga*, *Miscanthus* e *Sclerostachya*, um grande agrupamento intitulado Complexo *Saccharum* (DANIELS; ROACH, 1987; MUKHERJEE 1957). A caracterização molecular de acessos desse Complexo permite diferenciar, calcular a diversidade de acessos e sugerir futuros cruzamentos nos programas de melhoramento, fornecendo informações importantes também para a manutenção das coleções de germoplasma, uma vez que permitem comparar indivíduos e verificar possíveis trocas ou identificação errada entre os acessos.

Diversos trabalhos relacionados ao uso de marcadores moleculares para a caracterização de acessos selvagens de cana-de-açúcar tem sido produzidos (BROWN et al., 2007, CORDEIRO et al, 2003, COTO et al., 2002, DEVARUMATH et al. 2012). Nayak et al. (2014) utilizaram marcadores moleculares para avaliar a diversidade e a divergência genética de todos os acessos presentes na coleção de germoplasma de Miami, bem como para sugerir a formação de uma “Core Collection” baseada em um número menor de indivíduos, capaz de capturar parte da diversidade do banco. Creste et al. (2010) utilizaram marcadores moleculares para avaliar a variabilidade genética entre os genótipos utilizados como pais no programa de melhoramento do IAC (Instituto Agronômico de Campinas), gerenciando também, por meio desses, o monitoramento da identidade genética de coleções de germoplasma. Para Cordeiro et al. (2003) o uso de marcadores moleculares principalmente do tipo SSRs se mostraram ideais para a identificação da constituição genética de cultivares de cana modernas de origens interespecíficas.

Nesse contexto, o presente trabalho tem como objetivo realizar a caracterização molecular por meio de marcadores moleculares do tipo microssatélites de acessos do Complexo *Saccharum* para a sua futura utilização em programas de introgressão genética visando o desenvolvimento de cultivares de cana-de-açúcar com níveis maiores de biomassa ou açúcar e ainda produzir dados que possam ajudar na manutenção e preservação do banco de germoplasma do Instituto Agronômico de Campinas.

Material e Métodos

Genótipos

Os acessos estudados (Tabela 1) constituem parte componente do Banco de Germoplasma do Instituto Agronômico de Campinas. Nesse grupo estão incluídos acessos selvagens do Complexo *Saccharum*, cultivares comerciais e clones (*S. officinarum* x *S. spontaneum*) classificados como genitores elites com boas características fenotípicas para futuros cruzamentos pelo programa de melhoramento genético do Instituto Agronômico de Campinas (IAC) – Centro de Cana.

Tabela 1 – Relação dos 120 acessos do Complexo *Saccharum* avaliados com marcadores moleculares do tipo microssatélites.

Genótipo	Pedigree ou espécie	Genótipo	Pedigree ou espécie
75II09	<i>Erianthus</i>	IS 76-116	<i>S.officinarum</i>
CHUNEE	<i>S.barberi</i>	CAIANA MANTEIGA	<i>S.officinarum</i>
CHIN	<i>S.barberi</i>	SAC.OFF.8284	<i>S.officinarum</i>
GANDACHENI	<i>S.barberi</i>	CANA BLANCA	<i>S.officinarum</i>
IJ76293	<i>S. robustum</i>	CAIANA LISTRADA	<i>S.officinarum</i>
IM76229	<i>S. robustum</i>	SWART MANILLA	<i>S.officinarum</i>
57NG12	<i>S. robustum</i>	ZOPILOTA	<i>S.officinarum</i>
US571415	<i>S. robustum</i>	IS76155	<i>S.officinarum</i>
IN8458	<i>S. spontaneum</i>	AJAX	Badila x ?
IN8488	<i>S. spontaneum</i>	BADILA DE JAVA	<i>S.officinarum</i>
KRAKATAU	<i>S. spontaneum</i>	MZ151	<i>S.officinarum</i>
SES205A	<i>S. spontaneum</i>	CRIOLA RAIADA	<i>S.officinarum</i>
IN8482	<i>S. spontaneum</i>	IJ76566	<i>S.officinarum</i>
US-851008	<i>S. spontaneum</i> x US60-313	FORMOSA	<i>S.officinarum</i> x ?
MANERIA	<i>S. sinense</i>	CANA ALHO	<i>S.officinarum</i>
MUNTOK JAVA	<i>S. officinarum</i> x <i>S. spontaneum</i>	S.OFF82-80	<i>S.officinarum</i>
IJ76560	<i>S.officinarum</i>	NG7792	<i>S.officinarum</i>
IJ76317	<i>S.officinarum</i>	MANAII	<i>S.officinarum</i>
NG5750	<i>S. officinarum</i> x <i>S. spontaneum</i>	CREOULA	<i>S.officinarum</i>
NG57213	<i>S.officinarum</i>	NG57221	<i>S.officinarum</i>
NG21021	<i>S.officinarum</i>	SAC.OFF.8272	<i>S.officinarum</i>
IN84105	<i>S.officinarum</i>	SABURA	<i>S.officinarum</i>
IJ76418RED	<i>S.officinarum</i>	L.STRIPES	<i>S.officinarum</i>
CAIANA FITA	<i>S.officinarum</i>	NG77-018	<i>S.officinarum</i>
SAC.OFF.8276	<i>S.officinarum</i>	IJ76-313	<i>S.officinarum</i>
IJ76325	<i>S.officinarum</i>	FLOR DE CUBA	<i>S.officinarum</i> x ?
PITU	<i>S.officinarum</i>	CAIANA VERDADEIRA	<i>S.officinarum</i>
BADILA	<i>S.officinarum</i> x (NG9615 /NG14188)	IN84126	<i>S.officinarum</i>
IN84046	<i>S.officinarum</i>	BRAVO DE PERICO	<i>S.officinarum</i>
WHITE TRANSPARENT	<i>S.officinarum</i>	CAIANA RISCADA	<i>S.officinarum</i>
HJ5741	<i>S.officinarum</i>	FIJI62	<i>S.officinarum</i>
FIJI19	<i>S.officinarum</i>	CAIANA ROXA	<i>S.officinarum</i>
GREEN GERMAN	<i>S.officinarum</i>	*MALI	40SN1133 x MQ33371
CERAM RED	<i>S.officinarum</i>	MALI	40SN1133 x MQ33371
BLACK BORNEO	<i>S.officinarum</i>	IACSP973357	<i>S. officinarum</i> x <i>S. spontaneum</i>
LAM76-427	<i>S.officinarum</i>	RB855156	<i>S. officinarum</i> x <i>S. spontaneum</i>
MIDAS	Trojan x Vesta	IACSP962008	<i>S. officinarum</i> x <i>S. spontaneum</i>
DEMOS	Co270 x 33MQ371	IACSP973391	<i>S. officinarum</i> x <i>S. spontaneum</i>
MUNDAU	-	IACSP982053	<i>S. officinarum</i> x <i>S. spontaneum</i>
D52	B.cheribon x batjan	IACSP953028	<i>S. officinarum</i> x <i>S. spontaneum</i>
YASAWA	LF493863X MQ632717	IAC911099	<i>S. officinarum</i> x <i>S. spontaneum</i>
ENDOR	UBA x 28MQ674	IACSP933046	<i>S. officinarum</i> x <i>S. spontaneum</i>
ZEUS	TROJAN x MQ36-3717	IACSP983099	<i>S. officinarum</i> x <i>S. spontaneum</i>
RAGNAR	<i>S. officinarum</i> x <i>S. spontaneum</i>	SP80185	<i>S. officinarum</i> x <i>S. spontaneum</i>
CAIANA	<i>S. officinarum</i>	IACSP951218	<i>S. officinarum</i> x <i>S. spontaneum</i>
IACSP942101	<i>S. officinarum</i> x <i>S. spontaneum</i>	IACSP962042	<i>S. officinarum</i> x <i>S. spontaneum</i>
CTC9	<i>S. officinarum</i> x <i>S. spontaneum</i>	IACSP973354	<i>S. officinarum</i> x <i>S. spontaneum</i>
IACSP944004	<i>S. officinarum</i> x <i>S. spontaneum</i>	SP803280	<i>S. officinarum</i> x <i>S. spontaneum</i>
IACSP967569	<i>S. officinarum</i> x <i>S. spontaneum</i>	IACSP972003	<i>S. officinarum</i> x <i>S. spontaneum</i>
SP832847	<i>S. officinarum</i> x <i>S. spontaneum</i>	IACSP977065	<i>S. officinarum</i> x <i>S. spontaneum</i>
IACSP955094	<i>S. officinarum</i> x <i>S. spontaneum</i>	IACSP977077	<i>S. officinarum</i> x <i>S. spontaneum</i>
IACSP942094	<i>S. officinarum</i> x <i>S. spontaneum</i>	SP847017	<i>S. officinarum</i> x <i>S. spontaneum</i>
IACSP976628	<i>S. officinarum</i> x <i>S. spontaneum</i>	RB855453	<i>S. officinarum</i> x <i>S. spontaneum</i>
IACSP955000	<i>S. officinarum</i> x <i>S. spontaneum</i>	RB867515	<i>S. officinarum</i> x <i>S. spontaneum</i>
CTC4	<i>S. officinarum</i> x <i>S. spontaneum</i>	IACSP993032	<i>S. officinarum</i> x <i>S. spontaneum</i>
IACSP962019	<i>S. officinarum</i> x <i>S. spontaneum</i>	IACSP963055	<i>S. officinarum</i> x <i>S. spontaneum</i>
IACSP963060	<i>S. officinarum</i> x <i>S. spontaneum</i>	IACSP973009	<i>S. officinarum</i> x <i>S. spontaneum</i>
IACSP972084	<i>S. officinarum</i> x <i>S. spontaneum</i>	IACSP952078	<i>S. officinarum</i> x <i>S. spontaneum</i>
IACSP956671	<i>S. officinarum</i> x <i>S. spontaneum</i>	IACSP985011	<i>S. officinarum</i> x <i>S. spontaneum</i>
IACSP973015	<i>S. officinarum</i> x <i>S. spontaneum</i>	IACSP976680	<i>S. officinarum</i> x <i>S. spontaneum</i>

*os dois acessos Mali foram retirados de bancos de germoplasma diferentes.

Extração de DNA

O DNA utilizado nos testes moleculares foi extraído a partir de tecidos de folhas jovens armazenadas a -80°C de acordo com Al Janabi et al. (1999). Após o isolamento do DNA, a integridade e a concentração do mesmo foi verificada em gel de agarose (0,8%) e corado com brometo de etídio na presença de uma amostra padrão (DNA λ fago).

Amplificação dos locos de microssatélites (SSRs)

As reações de PCR foram efetuadas em um volume final de reação de 15 μ l contendo 40 ng do DNA molde, 0,2 μ M de cada par de primer (forward e reverse), 100 μ M de cada dNTP, 2,0 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, e 0,5 unidade de Taq DNA polimerase. O programa de amplificação constituiu de uma desnaturação inicial à 94 °C por 5 min, seguida de 30 ciclos, cada ciclo contendo uma etapa de desnaturação a 94 °C por 30 s, temperatura de anelamento específica para cada par de primer (forward/reverse) por 30 s, extensão a 72 °C por 30 s, e um ciclo final a 72 °C por 3 min.

Trinta pares de primers SSRs incluindo genômicos (SMC31CUQ, SMC2017FL, SMC1047HA, CIR12, CIR 51, CIR56, CIR74) e derivados de sequências expressas (SCB194, SCB67, SCB210, SCB303, SCB213, SCB312, SCB222, SCC01, SCB225, SCB436, SCC19, , SCB227, SCC25, SCA07, SCB248, SCC33, SCA48, SCB252, SCC44, SCB191, SCB381, SCC84 e CV38) foram utilizados. As seqüências de primers SSRs genômicos encontram-se descritas por Pan (2010), enquanto a dos EST-SSR foram descritos por Jordão Júnior (2009), Marconi et al. (2011), Oliveira et al. (2009) e Pinto et al. (2004).

Separação dos fragmentos amplificados

Os produtos de PCR foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante a 5%, utilizando o genotipador de DNA da Licor 4300 para os pares de primers de SSRs que se encontravam marcados com infra-vermelho (IR- IR700 ou

IR800) e coloração com nitrato de prata de acordo com o protocolo estabelecido por Creste et al. (2001), para os primers não marcados.

Análise de dados

As marcas produzidas pelos marcadores foram genotipados com base em sua presença (1) e ausência (0). A estimativa da dissimilaridade genética ($D = 1 - S$) entre os acessos foi calculada por meio do complemento da similaridade genética (S) obtida pelo coeficiente de Jaccard (1901). Optou-se pelo uso desse coeficiente devido ao fato do mesmo desconsiderar a ausência conjunta de bandas na comparação aos pares o que ajudaria a reduzir o excesso de estimativa similaridade como descrito em Cordeiro et al. (2003). As relações de dissimilaridade genética entre os acessos foram visualizadas pela construção de um dendrograma baseado no método de Neighbor Joining utilizando o programa Darwin 5 (PERRIER; JACQUEMOUD-COLLET, 2006). O método de agrupamento Neighbor Joining é amplamente utilizado para a construção de grandes filogenias devida a sua elegância, velocidade e pela sua capacidade de indicar a árvore mais correta filogeneticamente (BRUNO et al. 2000). Para constatar a consistência da topologia formada optou-se pela utilização do método de bootstrap com 1000 repetições.

Com base na matriz de dissimilaridade entre os acessos do gênero *Saccharum* (com exceção do acesso de *S. sinense* e *Erianthus* por se tratarem de um único indivíduo representante da sua espécie), foi calculada a dissimilaridade média dos acessos dentro de cada espécie (*S. barberi*, *S. robustum*, *S. spontaneum*, *S. officinarum* e híbridos antigos) e também para os chamados híbridos atuais (cultivares comerciais e clones – genitores elite, classificados como *S. officinarum* x *S. spontaneum*).

A análise da variância com os dados moleculares (AMOVA) foi realizada por meio do software Arlequin (EXCOFFIER et al., 1992), decompondo a variabilidade molecular entre e dentro das diferentes espécies.

Para essa análise também foram excluídos os acessos de *S. sinense* e *Erianthus* devido a existência de apenas um genótipo dos mesmos no banco de germoplasma estudado.

Apesar da premissa diploide sugerida pelo programa optou-se pela realização da análise da estrutura da população e do número de subpopulações presentes nos acessos estudados no STRUCTURE versão 2.3 (PRITCHARD; STEPHENS; DONNELLY, 2000) como realizado em Nayak et al. (2014). O modelo *admixture* foi o escolhido para a análise estrutural da população por levar em conta o fato de que cada indivíduo pode apresentar ancestrais em mais de uma população e pela opção de frequências alélicas correlacionadas entre populações (GONÇALVES, 2012). Inicialmente, avaliou-se a hipótese de K (número de subgrupos-subpopulações), variando de 1 a 10. Para cada K, o agrupamento mais provável foi obtido a partir de 100000 interações MCMC (*Monte Carlo Markov Chain*) após 100000 interações iniciais (*burnin*). A consistência dos resultados foi verificada pela execução do programa por 20 vezes para cada hipótese de K. As análises geradas pelo programa foram transferidas para o programa STRUCTURE HARVESTER v.0.6.92 (EARL; VONHOLDT, 2012), o qual determinou o número mais provável K, de acordo com EVANNO et al. (2005). Para essas análises também optou-se pela exclusão dos acessos de *S. sinense* e *Erianthus*.

Resultados e Discussão

Os 30 pares de primers geraram 427 marcas usadas para calcular a diversidade e a dissimilaridade genética entre os indivíduos (acessos selvagens e genitores elites). A dissimilaridade (D) entre os indivíduos variou de 0,070 a 0,879 tendo média de 0,586. A maior dissimilaridade genética (0,879) foi encontrada entre os indivíduos CTC4 (*S. officinarum* x *S. spontaneum*) e 751109 (*Erianthus*). Dentre os marcadores obtidos 6 estavam presentes apenas no acesso de *Erianthus* e que provavelmente correspondem a marcadores gênero específicos. Os acessos intitulados MALI apresentaram a menor dissimilaridade genética (0,070) entre todos os acessos estudados, sugerindo que se tratam talvez do mesmo genótipo. O mesmo ocorrendo com os acessos IJ76293 e IM76229 cuja dissimilaridade genética (0,098), também foi baixa em relação aos demais pares de acessos sugerindo que talvez possam corresponder ao mesmo genótipo.

Avaliando as relações de dissimilaridade genética, apenas entre os acessos selvagens, os genótipos NG57221 e o acesso de *Erianthus* 75II09 apresentaram maior dissimilaridade (0,865) enquanto a menor (0,117) foi verificada entre os acessos Crioula Raiada e Caiana Manteiga. Por outro lado, avaliando as relações de dissimilaridade genética apenas entre os genitores elites a maior dissimilaridade genética (0,604) ocorreu entre os acessos IACSP952078 e IACSP944004, enquanto a menor ocorreu (0,287) entre os acessos IACSP963055 e SP803280. A dissimilaridade média entre genitores provados foi de 0,481.

A dissimilaridade média entre os acessos foi menor entre os acessos de *S. barberi* e maior entre *S. officinarum* e híbridos antigos e *S. spontaneum* (Tabela 2).

Tabela 2 - Dissimilaridade média dentro e entre as diferentes espécies de *Saccharum*.

	<i>S. barberi</i>	<i>S. robustum</i>	<i>S. spontaneum</i>	<i>S. officinarum</i> e híbridos antigos	<i>S. officinarum</i> x <i>S. spontaneum</i> (variedades e clones atuais)
<i>S. barberi</i>	0.437	0.702	0.671	0.622	0.589
<i>S. robustum</i>		0.601	0.695	0.689	0.675
<i>S. spontaneum</i>			0.653	0.697	0.652
<i>S. officinarum</i> e híbridos antigos				0.561	0.581
<i>S. officinarum</i> x <i>S. spontaneum</i> (variedades e clones atuais)					0.481

De acordo com os resultados da AMOVA, observa-se que a maior parte da variabilidade se encontra dentro das espécies (84,93%) e o restante (15,07%) entre elas. Consequentemente, o valor observado de ϕ_{Fst} , o qual reflete a proporção da variabilidade molecular de haplótipos entre populações foi de 0,15 (Tabela 3).

Tabela 3 – Partição da diversidade genética dentro e entre as diferentes espécies de *Saccharum*

Fonte de variação	GL	SQ	% total da variação	ϕ_{Fst}
Entre espécies	4	776,189	15,07 (p<0,001)	0.15071
Dentro das espécies	113	5427,514	84,93 (p<0,001)	
Total	117	6203.703		

Na tabela 4 é possível a observação da diversidade genética, bem como o número de alelos médios de cada espécie analisada.

Tabela 4. Diversidade genética e número médio de alelos por loco para as espécies

	S. <i>barberi</i>	S. <i>robustum</i>	S. <i>spontaneum</i>	S. <i>officinatum</i>	S. <i>officinatum</i> x S. <i>spontaneum</i>
Diversidade	0.181	0.233	0.292	0.223	0.221
Nº médio alelos/ loco	6.433	7.100	9.700	12.266	9.966

Os resultados obtidos pela análise estrutural da população realizada pelo programa STRUCTURE mostraram um pico evidente no $K = 2$, valor de K no qual “Delta K ” é máximo, sugerindo que os acessos analisados sejam provenientes de duas subpopulações (Figura 1).

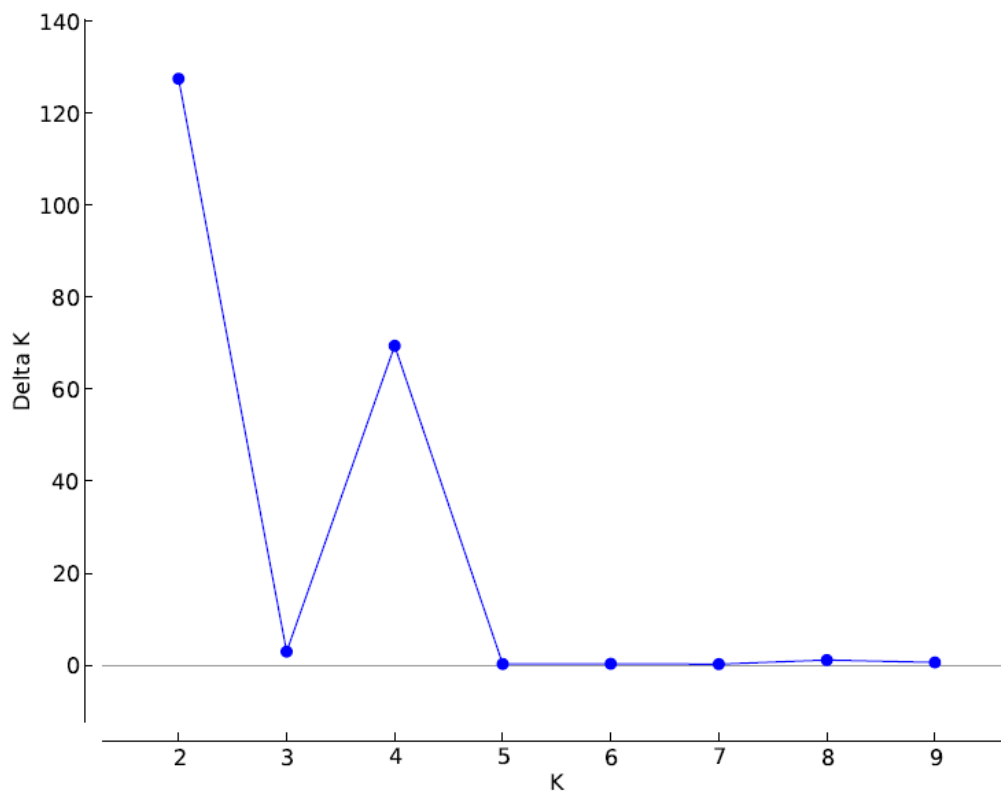


Figura 1 – Variação na magnitude de Delta K em função do número de subpopulações.

Considerando que haja duas subpovulações, a distribuição dos genótipos nas mesmas e a porcentagem do genoma compartilhada com o outro grupo é indicada pela Figura 2. De acordo com os resultados obtidos com o uso do programa computacional STRUCTURE (Figura 2) as duas subpovulações sugeridas incluíram acessos de diferentes espécies. A subpopulação 1 agrupou em sua maioria acessos de *S. officinarum*. Acessos como Caiana Manteiga, Badila de Java, Criola Raiada e Fiji 62 foram considerados acessos puros da subpopulação 1. A subpopulação 2 reuniu acessos de todas as espécies estudadas (*S. officinarum*, *S. spontaneum*, *S. barberi*, *S. robustum* e variedades comerciais, *S. officinarum* x *S. spontaneum*) não sendo possível encontrar acessos totalmente puros nesse grupo de acessos (Figura 2).

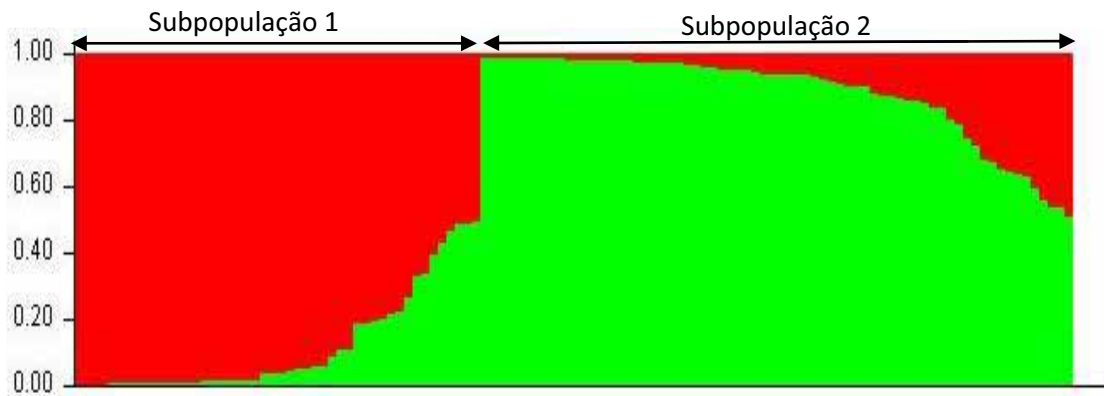


Figura 2 – Estrutura genética da população de acessos estudados do Complexo *Saccharum*. Cada indivíduo está segmentado de acordo com a fração de seu genoma (eixo vertical) compartilhada com a outra subpopulação. Cada cor representa uma subpopulação, e o comprimento do segmento colorido mostra a proporção de “outra subpopulação” em cada acesso estudado.

Além do pico mais evidente do $K=2$ outro pico menor é observado no valor de $K=4$ (Figura 1).

Quando analisado o gráfico da estrutura da população de acessos estudados considerando-se $K=4$ (Figura 3) os acessos de *S. barberi* e os acessos Ceramred e Endor (*S. officinarum*) foram agrupados na subpopulação 1. A maioria de acessos de *S. spontaneum*, os acessos IM76229, US5714105 e IJ76293 (*S. robustum*) e o acesso de *S. officinarum*, IS76155, foram agrupados na subpopulação 2. A subpopulação 3 reuniu uma grande quantidade de acessos de *S. officinarum* enquanto a subpopulação 4 agrupou grande parte das variedades atuais (*S. officinarum* x *S. spontaneum*).

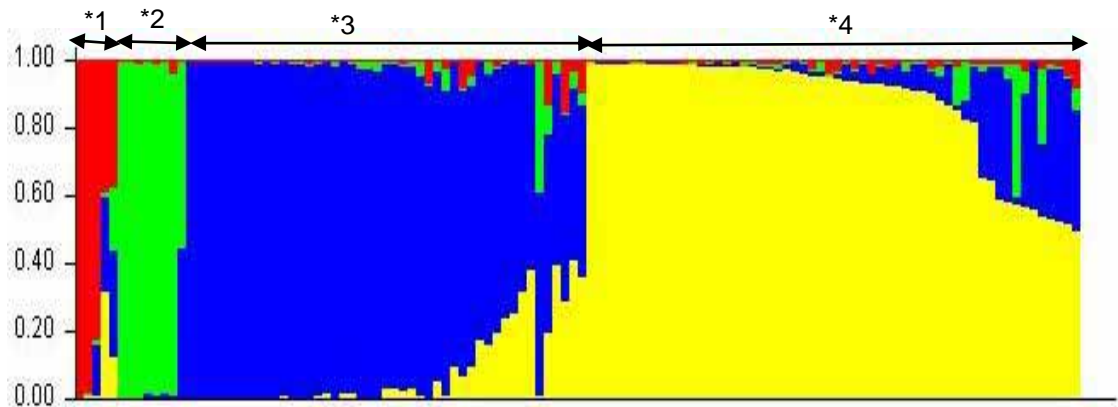


Figura 3 – Estrutura genética da população de acessos estudados do Complexo *Saccharum*. Cada indivíduo está segmentado de acordo com a fração de seu genoma (eixo vertical) compartilhada com a outra população. Cada cor representa uma subpopulação, e o comprimento do segmento colorido mostra a proporção de “parentesco” para cada acesso. * indica as diferentes subpopulações.

O dendrograma obtido com marcadores microssatélites mostrou a formação de três grandes grupos. O Grupo I (Figura 4) reuniu a grande maioria das espécies de *S. officinarum*, entre os acessos desse grupo é possível observar a presença de uma cultivar comercial (IACSP944004). Um acesso de *S. spontaneum* (IN8488) bem como o único acesso de *S. sinense* (Maneria) também estão presentes no Grupo I.

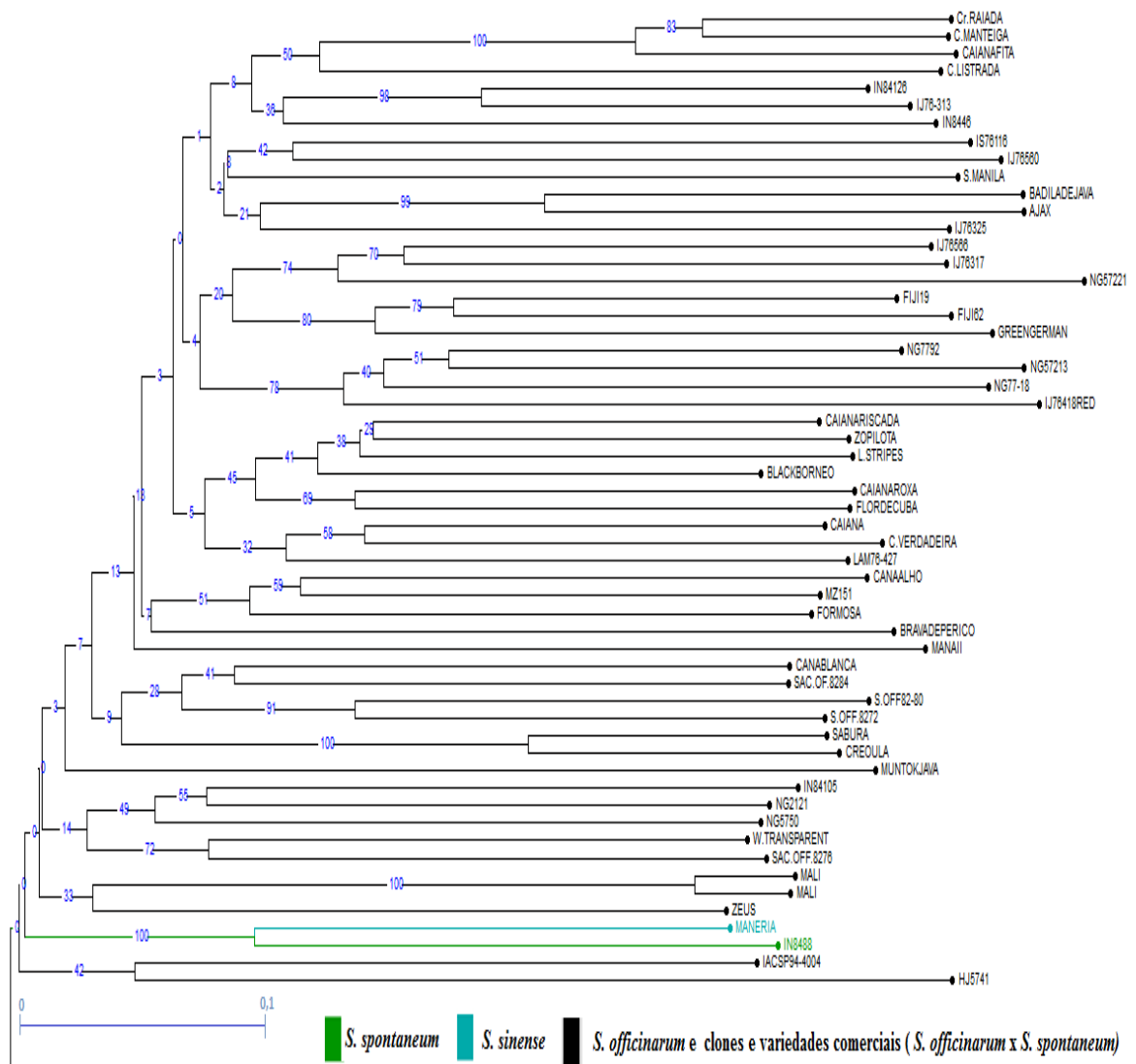


Figura 4 – Ramo 1 (Grupo I) do dendrograma dos acessos do Complexo *Saccharum* obtido pelo agrupamento Neighbor Joining apresentando as relações genéticas entre os acessos obtidas pelo complemento do coeficiente de similaridade de Jaccard. Os valores de bootstrap em porcentagem estão apresentados nos nós de cada agrupamento.

No Grupo II (Figura 5) foi alocado a maioria dos híbridos e cultivares comerciais atuais (*S. officinarum* x *S. spontaneum*). Nesse agrupamento foi possível notar a presença de um subgrupo formado por 2 espécies *S. officinarum* (PITU e BADILA).

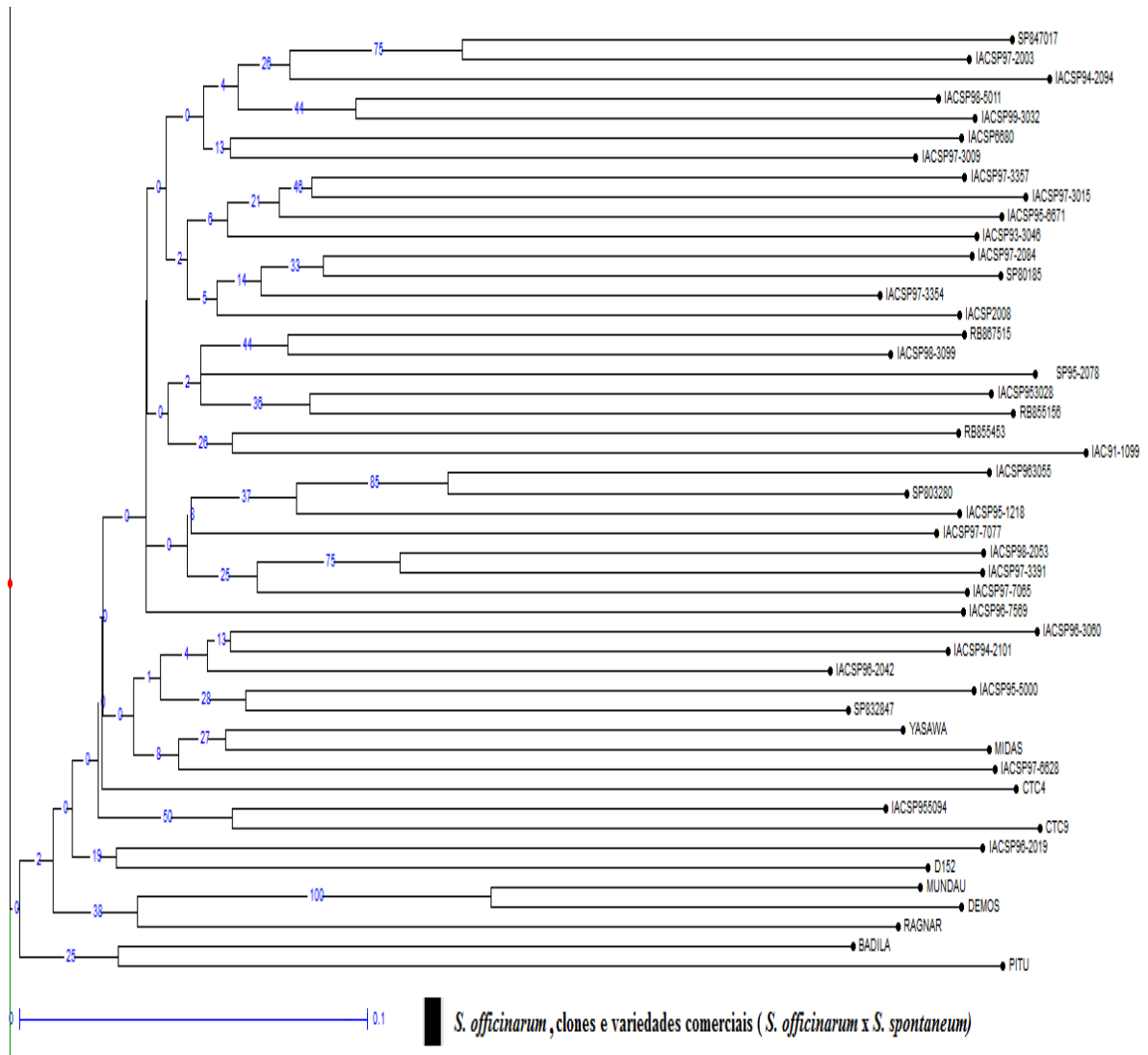


Figura 5 – Ramo 2 (Grupo II) do dendrograma dos acessos do Complexo *Saccharum* obtido pelo agrupamento Neighbor Joining apresentando as relações genéticas entre os acessos obtidas pelo complemento do coeficiente de similaridade de Jaccard. Os valores de bootstrap em porcentagem estão apresentados nos nós de cada agrupamento.

O Grupo III (Figura 6) reuniu a maioria das espécies diferentes de *S. officinarum* entre elas os acessos de *S. barberi*, *S. robustum*, *S. spontaneum* e *Erianthus* no

entanto, os acessos Endor, IS76155 e Ceranred, classificados como *S. officinarum* são observados nesse grupo. Esse grupo ainda pode ser dividido em dois subgrupos. O primeiro composto pelas espécies de *S. robustum*, *S. spontaneum* e *Erianthus* enquanto o segundo reuniu os acessos de *S. barberi*, Endor, IS76155 e Ceranred.

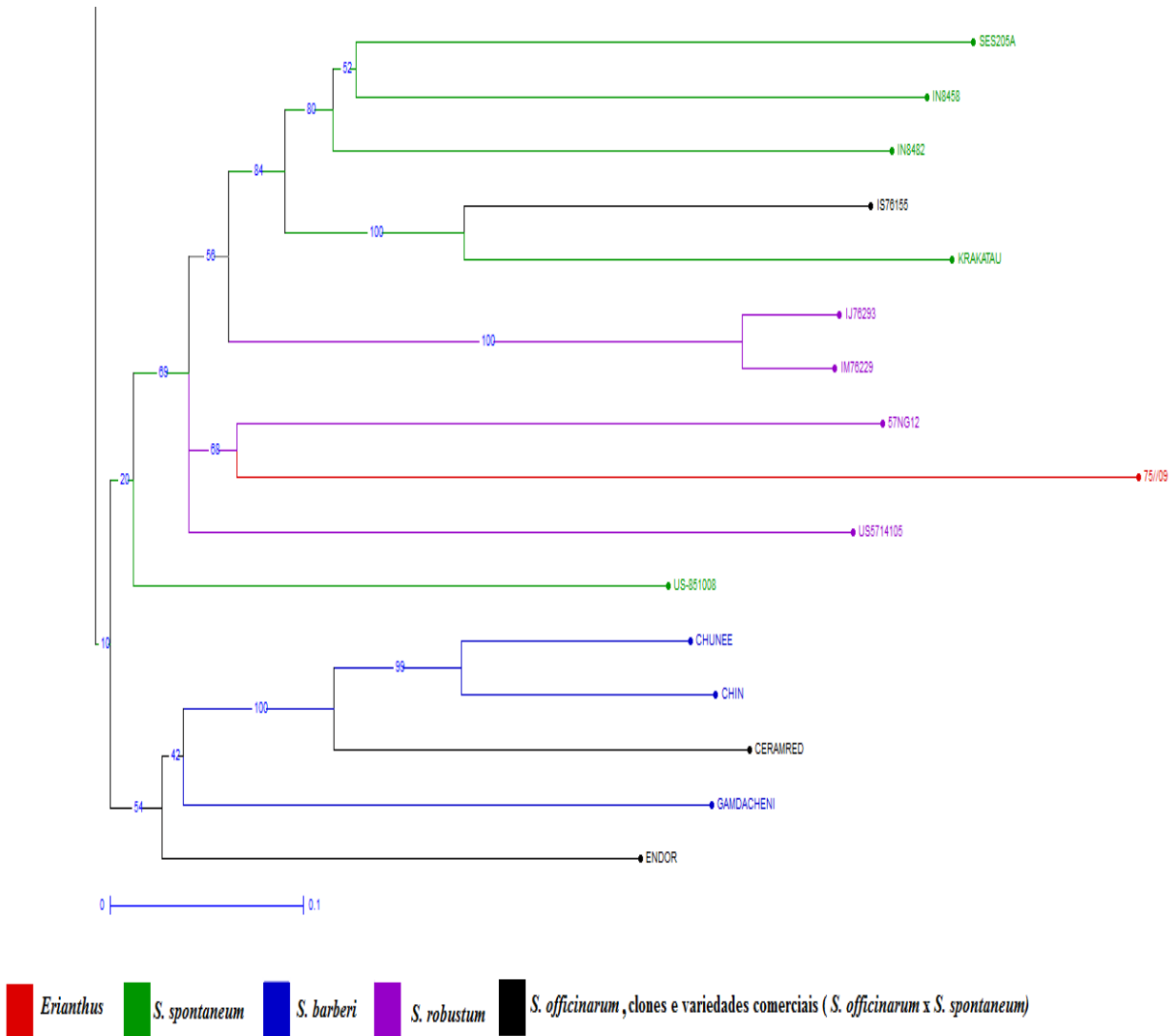


Figura 6 – Ramo 3 (Grupo III) do dendrograma dos acessos do Complexo *Saccharum* obtido pelo agrupamento Neighbor Joining apresentando as relações genéticas entre os acessos obtidas pelo complemento do coeficiente de similaridade de Jaccard. Os valores de bootstrap em porcentagem estão apresentados nos nós de cada agrupamento.

A maior dissimilaridade encontrada neste trabalho ocorreu entre uma cultivar comercial e o único acesso de *Erianthus*. Apesar da sua real inclusão no chamado Complexo *Saccharum* muitos são os questionamentos sobre a verdadeira participação desse gênero (*Erianthus*) nas cultivares comerciais de cana e nos diferentes acessos do complexo. Segundo Mukherjee (1957), o gênero *Erianthus* faz parte do Complexo *Saccharum* por ser considerado um parente próximo do gênero *Saccharum* e um possível contribuinte genético das cultivares modernas. No entanto, estudos atuais têm comprovado uma superestimação desse agrupamento, evidenciando pouca ou nenhuma contribuição desse gênero, nas cultivares atuais (GRIVET et al., 2004; BESSE et al., 1997). Esse fato também pode explicar a presença de seis alelos exclusivos do gênero. A pouca contribuição dessa espécie nas cultivares atuais de cana-de-açúcar se deve em parte à dificuldade da obtenção de híbridos intergenéricos férteis, praticamente eliminando a introgressão de genes (PIPERIDIS et al., 2010). A menor dissimilaridade genética entre os genótipos avaliados ocorreu entre os acessos intitulados MALI de diferentes bancos de germoplasma evidenciando o papel importante dos marcadores moleculares na gestão desses bancos uma vez que detectam a duplicidade do acesso. Os genótipos IJ76293 e IM76229 apresentaram também uma baixa dissimilaridade genética (0.098) sugerindo que os materiais são bastante parecidos o que indicaria um erro na identificação, trocas de materiais na gestão do germoplasma ou ainda acessos duplicados. De fato, em cana-de-açúcar é comum trocas e identificações erradas entre os acessos semelhantes. Isso ocorre principalmente pela falta de informações relativas ao fenótipo de cana-de-açúcar que apresenta acessos morfologicamente semelhantes, sendo essa falta de informação mais evidente entre os acessos antigos, menos estudados atualmente ou ainda pela dificuldade de se distinguir acessos muito semelhantes. Devido ao fato de essa espécie apresentar propagação vegetativa e rebrota fácil, é comum ocorrer misturas de toletes e consequentemente identificação errada de certos materiais nos diferentes grupos de estudo de cana-de-açúcar. Para Irvine (1999) a classificação do gênero *Saccharum* L. tem apresentado, ao longo dos anos, diversos problemas em relação à taxonomia, gerando debates sobre diferentes indivíduos. Nesse sentido, os marcadores moleculares têm papel fundamental na gestão e manutenção de bancos de germoplasma facilitando a identificação correta

de clones erroneamente identificados e permitindo a compreensão da distribuição da variabilidade genética entre acessos, espécies e gêneros relacionados (CRESTE et al., 2010, CORDEIRO et al., 2003). Além disso, informações relacionadas ao perfil molecular de diferentes acessos e clones podem vir a gerar no futuro um banco único de dados para a comparação de diferentes acessos das diversas coleções de germoplasma espalhadas pelo mundo (PAN et al., 2006).

Com exceção dos casos de acessos duplicados e provável identificação errada, a menor dissimilaridade ocorreu entre os acessos Crioula Raiada e Caiana Manteiga. De acordo com Figueiredo (2008) Crioula e Caiana foram os primeiros acessos de cana-de-açúcar introduzidos e cultivados no Brasil, portanto, provavelmente esses dois acessos podem ter um genitor em comum. Os acessos Caiana e Crioula podem ter sofrido, também no passado, hibridações naturais seguidas por seleções locais realizadas pelos nativos brasileiros que buscavam acessos de canas mais doces e macias, dando então, origem aos acessos Crioula Raiada e Caiana Manteiga.

De acordo com o dendrograma Grupo I (Figura 4) reuniu grande parte dos acessos de *S. officinarum*. Dentro dos acessos de *S. officinarum* e híbridos selvagens a dissimilaridade média encontrada foi de 0,56, valor semelhante foi indicado por Cordeiro et al. (2003). A baixa dissimilaridade genética entre acesso de *S. officinarum* pode ocorrer devido à seleção direcional dos mesmo para o aumento no teor de sacarose, espessura da cana e diminuição do teor de fibra (NAIR et al., 1998). A maior dissimilaridade entre os acessos de *S. officinarum* ocorreu com os acessos de *S. spontaneum*, de fato, morfologicamente esses genótipos apresentam grandes diferenças. De acordo com Butterfield et al. (2001), *S. officinarum* e *S. spontaneum* apresentam diferenças estruturais em seus genomas, evidentes em diversos trabalhos de mapeamento genético das espécies bem como nos diferentes rearranjos cromossômicos. A ocorrência de baixa dissimilaridade genética entre o grupo formado por *S. officinarum* e híbridos antigos com *S. barberi* pode ser explicada pelo número restrito de indivíduos dessa última espécie. Ainda no Grupo I, o acesso de *S. sinense* ocupou posição entre o único acesso de *S. spontaneum* (IN8488) do grupo e os demais acessos de *S. officinarum* e híbridos antigos. Diversos trabalhos evidenciam *S. sinense* como um híbrido natural de *S. spontaneum* e *S. officinarum* (LU et al., 1994; CORDEIRO et al., 2003). A cultivar IACSP94-4004 também agrupada neste grupo tem

incluída em sua formação cruzamentos de cultivares muito antigas como CO421, CO312 e H401184 o que poderia explicar o agrupamento desse genótipo em tal grupo.

O Grupo II (Figura 5) reuniu a grande maioria das cultivares atuais classificadas como cultivares e clones elites para futuros cruzamentos. Esse agrupamento conciso posicionou-se entre os grupos formados pela maioria dos acessos de *S. officinarum* e híbridos antigos, e entre o formado pela maioria dos acessos de *S. spontaneum*. Esse fato reflete a natureza híbrida das cultivares modernas de cana-de-açúcar, como sugerido por Irvine (1999), D'Hont et al. (1996) e Piperids et al. (2000). De fato, as cultivares atuais tiveram no passado a sua origem em cruzamentos interespecíficos entre *S. officinarum* e *S. spontaneum*. Os híbridos desses cruzamentos obtidos foram então, retrocruzados por diversas gerações com acessos de *S. officinarum* no processo que foi denominado de nobilitação. Desta forma, *Saccharum officinarum* é a espécie que mais contribuiu geneticamente nos cultivares de cana-de-açúcar atuais sendo responsável por cerca de 70 a 80% dos cromossomos das cultivares enquanto *S. spontaneum* contribui apenas com cerca de 20 a 30% dos cromossomos (D'HONT et al., 1998). De fato o processo de nobilitação também interferiu na divergência genética das cultivares atuais uma vez que a menor dissimilaridade (0,581) observada ocorreu quando comparada com as dos genótipos de *S. officinarum* e híbridos antigos. O fato de as cultivares atuais apresentarem geneticamente origens semelhantes pode explicar também a baixa dissimilaridade dentro das mesmas (0,481). Por apresentarem características de interesse para novos cruzamentos, a compreensão da semelhança e da diversidade e da dissimilaridade entre as cultivares comerciais e acessos do Complexo *Saccharum* pode ser importante estratégia para futuros trabalhos de introgressão nos programas de melhoramento genético de cana-de-açúcar. De acordo com Singh et al. (2010), o estabelecimento de relações entre híbridos de origem genética desconhecida e cultivares com ascendência conhecida pode colaborar com os programas de melhoramento de cana uma vez que permitem a seleção de genitores apropriados para aumentar os rendimentos no campo, bem como favorecem a manutenção da diversidade genética de uma população facilitando o planejamento de cruzamentos mais confiáveis em curto ou longo prazo.

No Grupo III (Figura 6) encontra-se a maioria dos acessos selvagens diferentes de *S. officinarum* e híbridos antigos. No primeiro subgrupo desse grupo é possível

observar a maioria dos acessos de *S. spontaneum*. Acessos de *S. spontaneum* apresentam diferentes números cromossômicos e ploidias diversas, o que pode gerar uma alta diversidade e dissimilaridade genética entre seus membros, no entanto, a dissimilaridade entre os acessos de *S. spontaneum* aqui avaliada foi moderada (0,65) indicando uma relativa homogeneidade do genoma das espécies estudadas, o que também foi sugerido por Nair et al. (1999). Entre os acessos de *S. spontaneum* foi possível observar um genótipo de *S. officinarum*, IS76155, problemas referentes a classificação taxonômica errada ou erro na identificação desse acesso pode ter ocorrido. Os acessos de *S. robustum* formaram um agrupamento bastante conciso neste grupo, neste pequeno agrupamento também está presente o acesso de *Erianthus*. Segundo Daniels et al. (1975) citados por Ferrari (2010), acredita-se que *S. robustum* pode ser originário de hibridações naturais de *S. spontaneum* ($2n=80$) com outros gêneros, como *Erianthus* e *Miscanthus*. No entanto, Cordeiro et al. (2003) e Lu et al. (1994), afirmam existir uma tendência de *S. robustum* aproximar-se geneticamente de *S. officinarum* uma vez *S. robustum* é considerado um de seus genitores. Nos trabalhos de Nayak et al. (2014), os acessos em *S. spontaneum* foram todos agrupados em um único grupo, híbridos, *S. officinarum*, *S. robustum*, *S. barberi*, *S. edule* e *S. sinense* se posicionaram em um novo grupo (grupo 2) enquanto, a maioria dos acessos de espécies desconhecidos e de outros gêneros, como *Erianthus*, foram alocados em um terceiro grupo diferente dos demais. Segundo Brown et al. (2007), diferentes agrupamentos formados em estudos em cana podem ocorrer pela análise errada dos dados obtidos ou ainda, pela análise diferente em relação aos diversos tipos de marcadores moleculares.

Em relação aos valores de dissimilaridade em espécies do gênero *Saccharum* é possível verificar diferentes informações na literatura. Devarumath et al. (2012), encontraram a menor dissimilaridade dentro dos acessos de *S. officinarum* e a maior entre acessos de *S. barberi*, neste presente trabalho esses valores ocorrem entre os acessos de *S. officinarum* x *S. spontaneum* (0,48 - menor dissimilaridade) e entre os acessos de *S. spontaneum* (0,65 – maior dissimilaridade). Lu et al. (1994), encontraram também a menor dissimilaridade dentro dos acessos de *S. officinarum* em seu trabalho no entanto, os mesmos não analisaram cultivares comerciais, a maior

dissimilaridade sugerida por esses autores ocorreu também entre os acessos de *S. spontaneum*.

Na Tabela 3 é possível observar que a diversidade genética encontrada nos acessos do Complexo *Saccharum* é maior dentro das espécies do que entre as mesmas. Nayak et al. (2014), encontraram resultados semelhantes em seus trabalhos com diversas espécies do Complexo *Saccharum* sendo 11% da diversidade encontrada entre os acessos e 89% dentro das populações das mesmas. Dutra Filho et al. (2013), observaram valor maior da diversidade dentro das progênies (87,75 e 85,19%) do que entre elas (12,25 e 14,81%) quando usados os marcadores moleculares RAPD e EST's SSR, respectivamente em 3 populações de autofecundação de cultivares comerciais. Glynn, McCorkle e Comstock (2009), em seus estudos com genótipos de cana da Flórida, da Lousiana e do Texas encontraram 3,4% da variação genética entre as populações e 96,6% dentro das populações.

Nos dados da tabela 4 é observado que os acessos da espécie *S. spontaneum* possuem maior diversidade genética entre si. Como já mencionado essa espécie tem ampla variabilidade devido a diferenças fenotípicas e as diversas ploidias existentes entre os acessos. O baixo valor de diversidade entre os acessos de *S. barberi* pode estar relacionada não só a características pouco variáveis entre os acessos, mas também devido ao número menor de acessos utilizados na pesquisa. O maior número médio de alelos por loco foi observado entre os acessos de *S. officinarum* o menor valor observado ficou entre os acessos de *S. barberi*.

Em relação a análise da estruturação populacional feita pelo programa STRUCTURE, discussões baseadas nos diferentes valores de K podem ser realizadas (Figura 1). A estruturação das subpopulações com K=2 refletida na Figura 2, sugere que uma subpopulação é formada por acessos mais puros de *S. officinarum*, enquanto a outra subpopulação se trataria da mistura de diferentes espécies. O valor K=2 pode ter ocorrido devido ao fato de que a maioria dos acessos estudados pertencem a *S. officinarum* e *S. officinarum* x *S. spontaneum* (variedades comerciais que passaram por diversos cruzamentos e processos seletivos) bem como, pela presença restrita de poucos acessos representativos de outras espécies na população estudada. Nayak et al. (2014), encontraram o valor de K=3 em seus trabalhos com acesso banco de germoplasma de Miami. Esse valor de K pode ter ocorrido principalmente pelo fato

desses autores utilizarem um maior número de acessos e espécies em seus estudos bem como, devido ao número maior de acessos para cada espécie analisada.

O valor K=4 se mostrou biologicamente mais próximo ao número de espécies na população estudada (*S. officinarum*, *S. robustum*, *S. spontaneum*, *S. barberi* e variedades atuais – *S. officinarum* x *S. spontaneum*), refletindo de forma mais real a história evolutiva do Complexo *Saccharum* sendo ainda observadas subpopulações mais próxima aos grupos relatados no dendrograma produzido. De acordo com Pritchard, Wen e Falush (2010) a interpretação biológica do K pelo programa STRUCTURE pode não ser simples sendo muitas vezes necessária uma análise da resposta natural (biológica) e não matemática dos valores produzidos.

Os dados obtidos neste trabalho têm grande valia para futuros cruzamentos realizados pelo programa de melhoramento de cana-de-açúcar do IAC- Centro de Cana. Estimativas de diversidade genética como as aqui apresentadas podem ser importante ferramenta para ajudar os melhoristas na seleção de pais mais divergentes para maximizar a heterose e segregação transgressiva em população genitoras permitindo assim aos pesquisadores concentrar a atenção e recursos nos cruzamentos mais promissores (ALWALA et al., 2006).

Conclusões

Os resultados aqui apresentados foram suficientes para caracterizar os diversos acessos do Complexo *Saccharum* analisados, permitindo estabelecer relações genéticas entre os mesmos bem como calcular valores de dissimilaridade e diversidade genética. Foi possível identificar acessos duplicados ou erroneamente classificados por meio de marcadores moleculares colaborando com a manutenção de bancos de germoplasma.

Referências bibliográficas

ALJANABI, S.; 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, n. 3, p. 281-281, 1999.

ALWALA, S.; KIMBENG, C.; GRAVOIS, K.; BISCHOFF, K. TRAP, a new tool for sugarcane breeding comparison with AFLP and coefficient of parentage. **Journal American Society Sugar Cane Technologists**, v. 26, p. 62-86, 2006.

BERDING, N.; ROACH, B. T. Germplasm collection, maintenance, and use. **Sugarcane improvement through breeding. Elsevier, Amsterdam**, v. 143, p. 210, 1987.

BESSE, P.; MCINTYRE, C. L.; BERDING, N. Characterisation of Erianthus sect. Ripidium and *Saccharum* germplasm (Andropogoneae-Saccharinae) using RFLP markers. **Euphytica**, v. 93, n. 3, p. 283-292, 1997

BROWN, J. S.; SCHNELL, R.; POWER, E.; DOUGLAS, S. L.; KUHN, D. N. Analysis of clonal germplasm from five *Saccharum* species: *S. barberi*, *S. robustum*, *S. officinarum*, *S. sinense* and *S. spontaneum*. A study of inter-and intra species relationships using microsatellite markers. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 54, n. 3, p. 627-648, 2007.

BRUNO, W. J.; SOCCI, N. D.; HALPERN, A. L. Weighted neighbor joining: a likelihood-based approach to distance-based phylogeny reconstruction. **Molecular Biology and Evolution**, v. 17, n. 1, p. 189-197, 2000.

BUTTERFIELD, M.; D'HONT, A.; BERDING, N. The sugarcane genome: a synthesis of current understanding, and lessons for breeding and biotechnology. In: Proc S Afr Sug Technol Ass, 2001Citeseer, p. 1-5.

CORDEIRO, G. M.; PAN, Y.-B.; HENRY, R. J. Sugarcane microsatellites for the assessment of genetic diversity in sugarcane germplasm. **Plant Science**, v. 165, n. 1, p. 181-189, 2003.

COTO, O.; CORNIDE, M. T.; CALVO, D.; CANALES, E.; D'HONT, A.; DE PRADA, F. Genetic diversity among wild sugarcane germplasm from Laos revealed with markers. **Euphytica**, v. 123, n. 1, p. 121-130, 2002.

CRESTE, S.; SANSOLI, D.; TARDIANI, A.; SILVA, D.; GONÇALVES, F.; FAVERO, T.; MEDEIROS, C.; FESTUCCI, C.; CARLINI-GARCIA, L.; LANDELL, M. Comparison of AFLP, TRAP and SSRs in the estimation of genetic relationships in sugarcane. **Sugar Tech**, v. 12, n. 2, p. 150-154, 2010.

DANIELS, J.; ROACH, B. T. Taxonomy and evolution. **Sugarcane improvement through breeding. Elsevier, Amsterdam**, v. 7, 1987.

DANIELS, J.; SMITH, P.; PATON, N.; WILLIAMS, C. The origin of the genus *Saccharum*. **Sugarcane Breed. Newsl**, v. 36, p. 24-39, 1975.

DEVARUMATH, R. M.; KALWADE, S. B.; KAWAR, P. G.; SUSHIR, K. V. Assessment of genetic diversity in sugarcane germplasm Using ISSR and SSR markers. **Sugar Tech**, v. 14, n. 4, p. 334-344, 2012.

D'HONT, A.; GRIVET, L.; FELDMANN, P.; GLASZMANN, J.; RAO, S.; BERDING, N. Characterisation of the double genome structure of modern sugarcane cultivars (*S. officinarum* x *S. spontaneum*) by molecular cytogenetics. **Molecular and General Genetics MGG**, v. 250, n. 4, p. 405-413, 1996.

D'HONT, A.; ISON, D.; ALIX, K.; ROUX, C.; GLASZMANN, J. C. Determination of basic chromosome numbers in the genus *Saccharum* by physical mapping of ribosomal RNA genes. **Genome**, v. 41, n. 2, p. 221-225, 1998.

D'HONT, A.; RAO, P.; FELDMANN, P.; GRIVET, L.; ISLAM-FARIDI, N.; TAYLOR, P.; GLASZMANN, J. Identification and characterisation of sugarcane intergeneric hybrids, *Saccharum officinarum* x *Erianthus arundinaceus*, with molecular markers and DNA in situ hybridisation. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 91, n. 2, p. 320-326, 1995.

DOS SANTOS, J. M.; DUARTE FILHO, L. S. C.; SORIANO, M. L.; DA SILVA, P. P.; NASCIMENTO, V. X.; DE SOUZA BARBOSA, G. V.; TODARO, A. R.; RAMALHO NETO, C. E.; ALMEIDA, C. Genetic diversity of the main progenitors of sugarcane from the RIDESA germplasm bank using SSR markers. **Industrial Crops and Products**, v. 40, p. 145-150, 2012.

DUTRA FILHO, J. A.; RESENDE, L. V.; BASTOS, G. Q.; NETO, D. E. S.; MACHADO, P. R. Utilização de marcadores moleculares RAPD e EST's SSR para estudo da variabilidade genética em cana-de-açúcar. **Revista Ciência Agronômica**, v. 44, n. 1, p. 141-149, 2013.

EARL, D. A., VONHOLDT, B. M. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources* vol. 4 (2) pp. 359-361, 2012.

EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 14, n. 8, p. 2611-2620, 2005.

EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P. E.; QUATTRO, J. M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**, v.131, p. 479-491,1992.

FERRARI, F. **Caracterização cromossômica em cana-de-açúcar (*Saccharum spp.,Poacea*)**, 2010, 91 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

FIGUEIREDO, P. Breve história da cana-de-açúcar e do papel do Instituto Agronômico no seu estabelecimento no Brasil. IN: DINARDO-MIRANDA, L.L.; DE VASCONCELOS, A.C.M.; LANDELL, M.G.A. . **Cana-de-açúcar**. 1. ed. Campinas: Instituto Agronômico, 2008, p. 31-44, 2008.

GLYNN, N. C.; MCCORKLE, K.; COMSTOCK, J. C. Diversity among mainland USA sugarcane cultivars examined by SSR genotyping. *J. Am. Soc. Sugar Cane Technol*, v. 29, p. 36-52, 2009.

GRIVET, L.; DANIELS, C.; GLASZMANN, J.-C.; D'HONT, A. A review of recent molecular genetics evidence for sugarcane evolution and domestication. 2004.

GONÇALVES, B. S. Identificação de marcadores moleculares relacionados à severidade de sintomas da ferrugem marrom em painel associativo de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.). 2012, 68 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia- Genética e Melhoramento de plantas) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Universidade Estadual Paulista, 2012.

IRVINE, J. *Saccharum* species as horticultural classes. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 98, n. 2, p. 186-194, 1999.

JACCARD, P. Etude comparative de la distribution florale dans une portion des Alpes et du Jura. **Bulletin de la Societt vaudoise des Sciences Naturelles**, n.37, p.547-579, 1901.

LU, Y.; D'HONT, A.; WALKER, D.; RAO, P.; FELDMANN, P.; GLASZMANN, J. Relationships among ancestral species of sugarcane revealed with RFLP using single copy maize nuclear probes. **Euphytica**, v. 78, n. 1-2, p. 7-18, 1994.

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.

MUKHERJEE, S. K. Origin and distribution of *Saccharum*. **Botanical Gazette**, p. 55-61, 1957.

NAIR, N. V.; NAIR, S.; SREENIVASAN, T.; MOHAN, M. Analysis of genetic diversity and phylogeny in *Saccharum* and related genera using RAPD markers. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 46, n. 1, p. 73-79, 1999.

NAIR, N.; BALAKRISHNAN, R.; SREENIVASAN, T. Variability for quantitative traits in exotic hybrid germplasm of sugarcane. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 45, n. 5, p. 459-463, 1998.

NAYAK, S. N.; SONG, J.; VILLA, A.; PATHAK, B.; AYALA-SILVA, T.; YANG, X.; TODD, J.; GLYNN, N. C.; KUHN, D. N.; GLAZ, B. Promoting Utilization of *Saccharum* spp. Genetic Resources through Genetic Diversity Analysis and Core Collection Construction. **PloS one**, v. 9, n. 10, p. e110856, 2014.

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

PAN, Y.-B.; TEW, T.; SCHNELL, R.; VIATOR, R.; RICHARD, E.; GRISHAM, M.; WHITE, W. Microsatellite DNA marker-assisted selection of *Saccharum spontaneum* cytoplasm-derived germplasm. **Sugar Tech**, v. 8, n. 1, p. 23-29, 2006

PAN, Y.B. Databasing Molecular Identities of Sugarcane (*Saccharum* spp.) Clones Constructed with Microsatellite (SSR) DNA Markers. **American Journal of Plant Sciences**, v.1, p.87-94, 2010.

PERRIER, X., JACQUEMOUD-COLLET, J.P. **DARwin software**. Disponível em: <http://darwin.cirad.fr/darwin>. 2006.

PINTO, L. R.; OLIVEIRA, K. M.; ULIAN, E. C.; GARCIA, A. A. F.; DE SOUZA, A. P. Survey in the sugarcane expressed sequence tag database (SUCEST) for simple sequence repeats. **Genome**, v. 47, n. 5, p. 795-804, 2004.

PIPERIDIS, G.; CHRISTOPHER, M. J.; CARROLL, B. J.; BERDING, N.; D'HONT, A. Molecular contribution to selection of intergeneric hybrids between sugarcane and the wild species *Erianthus arundinaceus*. **Genome**, v. 43, n. 6, p. 1033-1037, 2000.

PIPERIDIS, N.; CHEN, J.; DENG, H.; WANG, L.; JACKSON, P.; PIPERIDIS G. GISH characterization of *Erianthus arundinaceus* chromosomes in three generations of sugarcane intergeneric hybrids. **Genome**, Canadá, v.53, p.331-336, 2010.

PRITCHARD, J.K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, Baltimore, v. 155, n. 2, p. 945-959, 2000.

PRITCHARD, J. K.; WEN, W.; FALUSH, D. Documentation for STRUCTURE software: version 2.3. 2010.

RAM, B.; SREENIVASAN, T.; SAHI, B.; SINGH, N. Introgression of low temperature tolerance and red rot resistance from *Erianthus* in sugarcane. **Euphytica**, v. 122, n. 1, p. 145-153, 2001.

RAO, N. K. Plant genetic resources: advancing conservation and use through biotechnology. **African Journal of biotechnology**, v. 3, n. 2, p. 136-145, 2004.

ROQUE, P. Cana para a indústria: os rumos da pesquisa. **AgroANALYSIS**, v. 34, n. 01, p. 6-8, 2014.

SANTCHURN, D.; RAMDOYAL, K.; BADALOO, M. G. H.; LABUSCHAGNE, M. From sugar industry to cane industry: investigations on multivariate data analysis techniques in the identification of different high biomass sugarcane varieties. **Euphytica**, v. 185, n. 3, p. 543-558, 2012.

SINGH, R.; MISHRA, S. K.; SINGH, S. P.; MISHRA, N.; SHARMA, M. Evaluation of microsatellite markers for genetic diversity analysis among sugarcane species and commercial hybrids. **Australian Journal of Crop Science**, v. 4, n. 2, p. 116, 2010.

TODD, J.; WANG, J.; GLAZ, B.; SOOD, S.; AYALA-SILVA, T.; NAYAK, S. N.; GLYNN, N. C.; GUTIERREZ, O. A.; KUHN, D. N.; TAHIR, M. Phenotypic characterization of the Miami World Collection of sugarcane (*Saccharum* spp.) and related grasses for selecting a representative core. **Genetic Resources and Crop Evolution**, p. 1-16, 2014.

VILLALOBOS, V.; ENGELMANN, F. Ex situ conservation of plant germplasm using biotechnology. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 11, n. 4, p. 375-382, 1995.

CAPÍTULO 3 – Caracterização fenotípica dos acessos do Complexo *Saccharum*

RESUMO: Uma das principais maneiras de se caracterizar genótipos de cana-de-açúcar se dá por meio de estudos fenotípicos (agronômicos). Com base nos resultados desses estudos é possível inferir sobre o comportamento de cada genótipo em campo gerando importantes informações para os melhoristas tanto no que diz respeito à manutenção de bancos de germoplasma *ex situ* quanto na escolha de futuros cruzamentos para a obtenção de novas cultivares. O presente trabalho tem como objetivo caracterizar fenotipicamente acessos selvagens do Complexo *Saccharum* para serem utilizados no programa de melhoramento genético do IAC. Para isso, diferentes acessos do Complexo *Saccharum* foram levados a campo, sendo os mesmos caracterizados em termos de descritores morfológicos, atributos de qualidade e de produção. Os dados produzidos nessa caracterização foram utilizados para o cálculo da distância euclidiana entre os acessos, análise de agrupamento e assim como para a análise dos componentes principais. Baseado na caracterização, foi possível elencar diferentes genótipos contrastantes sendo os acessos de *S. spontaneum* e *Erianthus* os mais destacados em relação à fibra e à produção de colmos e os acessos de *S. officinarum* responsáveis pela alta concentração de açúcar e caracteres relacionados à sacarose. Os componentes principais 1 e 2 foram responsáveis por explicar 83% da variação encontrada entre os acessos. De acordo com os resultados produzidos foi possível classificar os acessos do Complexo *Saccharum*, bem como permitir compreender melhor do comportamento desses genótipos em campo. As informações agronômicas dos acessos selvagens de cana-de-açúcar se mostraram eficientes para sugerir materiais para introgressão nos programas de melhoramento do IAC e demais.

Palavras-chave: componentes principais, atributos de qualidade, atributos de produção, descritores morfológicos, cana-de-açúcar

Introdução

A caracterização agronômica dos acessos que compõem os bancos de germoplasma é fundamental para os Programas de Introgressão Genética. Em cana-de-açúcar, as avaliações de atributos morfológicos, atributos de qualidade e de produção permitem aos melhoristas não apenas estimar os níveis de variabilidade genética para estas variáveis nas coleções como identificar acessos a serem utilizadas no Programa de Introgressão. De acordo com Todd et al. (2014), a caracterização fenotípica é capaz de ajudar os melhoristas na seleção de germoplasma útil, permitindo ainda uma avaliação da diversidade em campo. Para Nair, Balakrishnan e Sreenivasan (2008) este tipo de estudo é um pré-requisito indispensável para o uso efetivo de acessos em programas de melhoramento.

Atributos de qualidade, que serão definidos a seguir, tais como Pol%, Brix, peso do bolo úmido (PBU), conteúdo de açúcares totais recuperáveis por tonelada de cana e componentes de produção (altura, diâmetro e número de colmos) têm sido utilizados por todos os programas de melhoramento, assim como pela própria indústria sucroalcooleira para determinar a qualidade da matéria-prima plantada ou adquirida.

O peso do bagaço (bolo) úmido (PBU) é utilizado para o cálculo da fibra da cana. Este dado é de grande relevância na agroindústria canavieira, uma vez que as cultivares mais ricas em fibras têm alta resistência ao tombamento, sendo também mais resistente a doenças (LAVANHOLI, 2008). O aumento desse atributo tem atraído a atenção dos melhoristas uma vez que a fibra produzida durante os processos de fabricação de açúcar e álcool pode ser também utilizada como fonte de energia elétrica e de etanol celulósico (LEITE, 2010, MANCINI, 2010).

O ATR (Açúcares totais recuperáveis) de acordo com a ÚNICA (2014) corresponde à quantidade de açúcar disponível na matéria-prima subtraindo-se as perdas do processo industrial, sendo esse valor utilizado na comercialização da tonelada da cana.

O caráter Pol% pode ser entendido como o percentual aparente de sacarose contida em uma solução de açúcares, sendo sua determinação obtida por meio de métodos sacarimétricos, baseados no desvio da luz causado pelos açúcares (FERNANDES, 2000).

A capacidade de um acesso produzir maior número de colmos é de grande valia para os programas de melhoramento genético de cana. O elevado número de colmos pode em determinados casos agregar á variedade maior quantidade de açúcar, fibra e biomassa. No contexto atual da busca pela cana-energia, genótipos com essa característica podem ser mais atrativos. De acordo com Milligan et al. (1990), esse fator influencia fortemente o cálculo da tonelagem de cana por hectare (TCH), principalmente em cana soca.

Além do número, estudos relacionados ao diâmetro do colmo são também realizados nos diversos programas de melhoramento de cana-de-açúcar no Brasil e no mundo. Normalmente, colmos com maior diâmetro apresentam maior quantidade de açúcar e água, enquanto colmos mais finos tem alto teor de fibra. De acordo com Bressiani (2001) os valores de diâmetro de colmo são utilizados no cálculo do peso por colmo, sendo esse último valor participante do cálculo do TCH.

A altura das plantas tem relevância também entre as características fenotípicas utilizadas nos programas de melhoramento. De acordo com Alvarez e Castro (1999) o caráter altura pode ser indicador de estresses abióticos como por exemplo, ataques por cigarrinha.

São poucas as informações referentes á caracterização de acessos antigos em cana (TODD et al., 2014). Além disso, muitas vezes os dados produzidos em campo para a caracterização dos acessos geram um número muito grande de informações, o que torna difícil ao melhorista elencar genótipos que agreguem o máximo das características que se pretende selecionar em uma progênie ou em um provável genitor de cruzamentos. Análises estatísticas, como a análise multivariada são capazes de converter informações referentes a diversos caracteres em único índice que permite gerenciar melhor as escolhas de futuros genitores (NETO; MOITA, 1998, VICINI; SOUZA, 2005). A análise dos componentes principais e de agrupamento podem trazer informações relevantes para os programas de melhoramento que buscam realizar cruzamentos para a obtenção de novas variedades.

A distância euclidiana é uma medida usualmente empregada para calcular a distância entre dois pontos em um espaço n-dimensional. Por meio de algum método de agrupamento dos dados calculados por essa distância é possível se produzir dendrogramas que facilitem a visualização de semelhanças entre amostras ou

objetos, principalmente quando esses dados de semelhanças apresentam dimensão maior do que três, visto que, neste caso a representação de gráficos convencionais é impossível (NETO; MOITA, 1998).

A Análise de Componentes Principais (ACP) é capaz de transformar um conjunto de variáveis em um grupo efetivamente menor de características não correlacionadas que irão organizar a maior parte das informações obtidas no conjunto inicial (FLECK; BOURDEL, 1998).

Dessa forma, o presente trabalho tem como objetivo caracterizar fenotipicamente acessos selvagens do Complexo *Saccharum* para serem utilizados no Programa de Introgessão para Biomassa do IAC.

Material e Métodos

Genótipos

Cinquenta e cinco acessos de cana (Tabela 1) além dos cultivares IACSP95-5000 (T1) e IACSP93-3046 (T2) foram caracterizados fenotipicamente.

Tabela 1 – Acessos do Complexo *Saccharum* usados na caracterização agrônômica.

Acessos	Pedigree ou espécie	Acessos	Pedigree ou espécie	Acessos	Pedigree ou espécie
57NG-12	<i>S. robustum</i>	IJ76-317	<i>S. officinarum</i>	NG21-21	<i>S. officinarum</i>
72II09	<i>Erianthus</i>	IJ76-325	<i>S. officinarum</i>	NG57-213	<i>S. officinarum</i>
AJAX	Badila x ?	IJ76-326	<i>S. officinarum</i>	NG57-221	<i>S. officinarum</i>
BADILA	<i>S. officinarum</i> x (NG9615 /NG14188)	IJ76-418 RED	<i>S. officinarum</i>	NG57-50	<i>S. officinarum</i> x <i>S. spontaneum</i> (<i>S. officinarum</i> x ?)
BADILA JAVA	<i>S. officinarum</i>	IJ76-560	<i>S. officinarum</i>	NG57-6	-
CAIANA	<i>S. officinarum</i>	IJ76-566	<i>S. officinarum</i>	NG7718	<i>S. officinarum</i>
CAIANA FITA	<i>S. officinarum</i>	IM 76-229	<i>S. robustum</i>	PITU	<i>S. officinarum</i>
CAIANA	<i>S. officinarum</i>	IN84-105	<i>S. officinarum</i>	RP-8	<i>S. officinarum</i> x <i>S. spontaneum</i>
RISCADA				SABURA	<i>S. officinarum</i>
CAIANA VERDADEIRA	<i>S. officinarum</i>	IN84-106	<i>S. officinarum</i>		
CANA ALHO	<i>S. officinarum</i>	IN84-126	<i>S. officinarum</i>	SAC. OFFC.8276	<i>S. officinarum</i>
CERAM RED	<i>S. officinarum</i>	IN84-58	<i>S. spontaneum</i>	SAC. OFFC.8284	<i>S. officinarum</i>
CHIN	<i>S. barberi</i>	IN84-82	<i>S. spontaneum</i>	SES 205 A	<i>S. spontaneum</i>
CHUNEE	<i>S. barberi</i>	IN84-88	<i>S. spontaneum</i>	UBA-DEMERARA	<i>S. sinense</i>
FIJI 19	<i>S. officinarum</i>	IS 76-155	<i>S. officinarum</i>	US 57-141-5	<i>S. robustum</i>
FORMOSA	<i>S. officinarum</i> x ?	IS76-116	<i>S. officinarum</i>	US85-1008	<i>S. spontaneum</i> x US60-313
GANDA CHENI	<i>S. barberi</i>	KRAKATA U	<i>S. spontaneum</i>	WHITE_TRANSPAREN T	<i>S. officinarum</i>
IJ 76-313	<i>S. officinarum</i>	LOUSIANA SEMPEOL	-	ZOPILOTA	<i>S. officinarum</i>

Continuação...

Tabela 1 – Acessos do Complexo *Saccharum* usados na caracterização agrônômica.

Acessos	Pedigree ou espécie	Acessos	Pedigree ou espécie	Acessos	Pedigree ou espécie
IJ76-293	<i>S. robustum</i>	MANTEIGA	<i>S. officinarum</i>	T1 (IACSP95-5000)	<i>S. officinarum</i> x <i>S. spontaneum</i>
NG21-17	<i>S. officinarum</i>	MZT151	<i>S. officinarum</i>	T2 (IACSP93-3046)	<i>S. officinarum</i> x <i>S. spontaneum</i>

Delineamento experimental

O experimento foi instalado no Centro de Cana do Instituto Agrônômico de Campinas, localizado em Ribeirão Preto, no estado de São Paulo, Brasil. Foi utilizado delineamento de blocos ao acaso com três repetições, constituído de parcelas de 1 metro de comprimento, espaçadas 1m entre parcelas e 1,5 m entre linhas e adotando-se as cultivares IACSP95-5000 (T1) e IACSP93-3046 (T2) como testemunhas. Para a instalação do ensaio foram utilizadas 3 mudas pré-brotadas (MPB) segundo IAC (2014) para cada parcela.

Caracterização morfológica

Os acessos foram caracterizados morfológicamente, em relação a: crescimento da touceira, intensidade de perfilhamento, comprimento dos entrenós medido no terço médio do colmo e a saliência da gema no nó. Para estes caracteres foram dadas notas de acordo com o documento “Descritores mínimos de cana-de-açúcar” expedido pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (1998). O hábito de crescimento da touceira foi classificado como ereto (nota 1), levemente decumbente (nota 3) e decumbente (nota 5) para a intensidade de perfilhamento os acessos foram classificados com as seguintes notas: 3 (baixa), 5 (média) e 7 (alta), em relação ao comprimento dos entrenós medido no terço médio do colmo os acessos foram classificados em: curto (3), médio (5) e longo (7). Para o caráter saliência da gema no nó, a classificação se deu da seguinte forma: pouca (1), média (3) ou muita (5).

Atributos de qualidade e de produção

Após 10 meses do plantio das mudas, foram avaliados componentes de produção: altura da touceira (A, em metros), número de colmos por parcela (colmos), diâmetro médio de 10 colmos (DM, em mm), peso de 10 colmos (PC10, em kg) e parâmetros de qualidade: teor de sólidos solúveis no caldo (Brix, em graus), peso de bolo úmido (PBU, t.ha⁻¹), conteúdo de fibra no bagaço (%), porcentagem, em massa, de sacarose aparente na cana (Pol, em %) e conteúdo de açúcares totais recuperáveis por tonelada de cana (ATR). Os mesmos dados foram coletados também em cana soca em junho de 2013. Os parâmetros de qualidade foram mensurados a partir de amostras de 10 de colmos de cana-de-açúcar coletadas de cada material, de acordo com os métodos descritos no guia CONSECANA (2006).

A análise de variância referente aos dados da cana planta e a cana soca foram realizadas no programa estatístico SAS (SAS INSTITUTE, 2008). Estes tiveram as médias ajustadas e comparadas pelo teste-T. A análise de variância foi conduzida para detectar os efeitos entre os blocos e acessos como também para estimar o coeficiente de variação (CV%).

Análise de agrupamento e componentes principais

Os dados referentes aos componentes de produção e parâmetro de qualidade obtidos anteriormente foram analisados por meio de estatística na tentativa de se entender melhor o comportamento dos acessos em campo. Para obter os valores genotípicos a serem utilizados nas análises de agrupamento e de componentes principais, os dados fenotípicos foram primeiramente analisados, considerando abordagem de modelos mistos. O modelo estatístico adotado, no qual variáveis sublinhadas foram consideradas aleatórias foi: $\underline{y}_{ijk} = \mu + b_{jk} + h_k + \underline{g}_i + \underline{gh}_{ik} + \underline{\varepsilon}_{ijk}$, em que \underline{y}_{ijk} é o valor da observação referente ao genótipo i (com $i = 1, \dots, n$), no bloco j (com $j = 1, 2, 3$), no corte k (com $k = 1, 2$); μ é uma constante; h_k é o efeito de cortes; b_{jk} é o efeito de blocos dentro de cortes; \underline{g}_i é o efeito de genótipos; \underline{gh}_{ik} é o efeito da interação entre genótipos e cortes; ε_{ijk} é o erro experimental.

Utilizando notação matemática semelhante a adotada por Eckermann et al. (2001), Verbyla et al. (2003), Boer et al. (2007) e Pastina et al. (2012) os n genótipos foram divididos em dois grupos, acessos e testemunhas, com n_a e n_t genótipos,

respectivamente, sendo $n = n_a + n_t$. Desse modo, o efeito de genótipos g_i foi composto pelos efeitos aleatório de acessos (a_i) e fixo de testemunhas (t_i), enquanto o efeito da interação genótipos x cortes resultou da soma dos efeitos aleatório da interação acessos x cortes (ah_{ik}) e fixo da interação testemunhas x cortes (th_{ik}). Para cada caráter avaliado, foram testadas diferentes estruturas de matrizes de variâncias e covariâncias associadas aos efeitos genéticos aleatórios e aos efeitos aleatórios residuais. Os modelos mistos testados, por caráter, foram comparados pelos critérios de Akaike - "Akaike Information Criteria" - AIC (AKAIKE, 1974) e Bayesiano - "Bayesian Information Criteria" - BIC (SCHWARZ, 1978). Com base no modelo misto selecionado por característica estudada, foram obtidos os preditores BLUPs ("Best Linear Unbiased Predictions") dos efeitos aleatórios dos acessos e os estimadores BLUEs ("Best Linear Unbiased Estimators") dos efeitos fixos das testemunhas. Esses BLUPs e BLUEs foram utilizados nas análises multivariadas descritas posteriormente. As análises de modelos mistos foram realizadas no programa GenStat Discovery (PAYNE et al., 2011), com uso do método de máxima verossimilhança restrita (REML).

Com base nos BLUPs e BLUEs obtidos nas análises de modelos mistos, foram realizadas as análises multivariadas (SNEATH; SOKAL, 1973; MANLY, 2004) entre os genótipos (acessos e testemunhas), considerando tanto os caracteres relacionados aos componentes de produção (A, COLMOS, DM10 e PC10), quanto os tecnológicos (Brix, PBU, Fibra e Pol).

Primeiramente, calculou-se a matriz de distâncias euclidianas entre pares de genótipos, a partir da qual foi realizada a análise de agrupamento UPGMA ("Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean"), visando identificar se existe algum padrão de variabilidade entre genótipos em função das características avaliadas.

Adicionalmente, foi feita a análise de componentes principais (ACP), com base em matriz de correlação entre caracteres, para verificar se os genótipos tendem a se agrupar e quais as variáveis mais influentes na determinação desses grupos, o que pôde ser visualizado por meio de gráfico tipo "biplot" (GABRIEL, 1971). Todas as análises multivariadas foram realizadas com uso do software estatístico R (R Core Team, 2013).

Resultados e Discussão

Caracterização morfológica

Para a maioria dos acessos analisados, o hábito de crescimento da touceira foi do tipo decumbente (Figura 1). Esse tipo de hábito de crescimento não é interessante atualmente uma vez que materiais de hábito pouco ereto podem gerar impactos negativos na colheita mecanizada da cana-de-açúcar, isso porque junto ao corte desses materiais são agregadas impurezas minerais.

Para o caráter morfológico, intensidade de perfilhamento, a maioria dos acessos recebeu nota mínima (Figura 1) que significa baixa intensidade de perfilhamento embora nesse trabalho tenha sido possível verificar uma amplitude grande em números de perfilho. Exemplares de *S. spontaneum* apresentaram o maior grau de perfilhamento, fato extremamente interessante para o melhoramento da cana-de-açúcar visando o incremento de biomassa. Para o comprimento dos entrenós medido no terço médio, verificou-se que a maior parte dos acessos estudados receberam nota 3 sendo classificado como curto. Entrenó curto é uma característica muito presente em materiais considerados mais antigos. A grande vantagem da ocorrência de entrenós de tamanho médio a longos está ligada a presença de maior quantidade de caldo e consequente facilidade de extração do mesmo nas usinas bem como ocorrência de porte mais ereto em relação a materiais de colmos curtos.

Para o caráter saliência da gema no nó, a maioria dos genótipos foi classificada com pouca saliência da gema (Figura 1). Plantas com gemas pouco salientes apresentam mais resistência a danos ao plantio mecânico da cana. Quanto mais embutida for a gema menor será o dano causado no replantio, seja esse causado pela ação mecânica dos implementos agrícolas ou por intemperes ambientais.

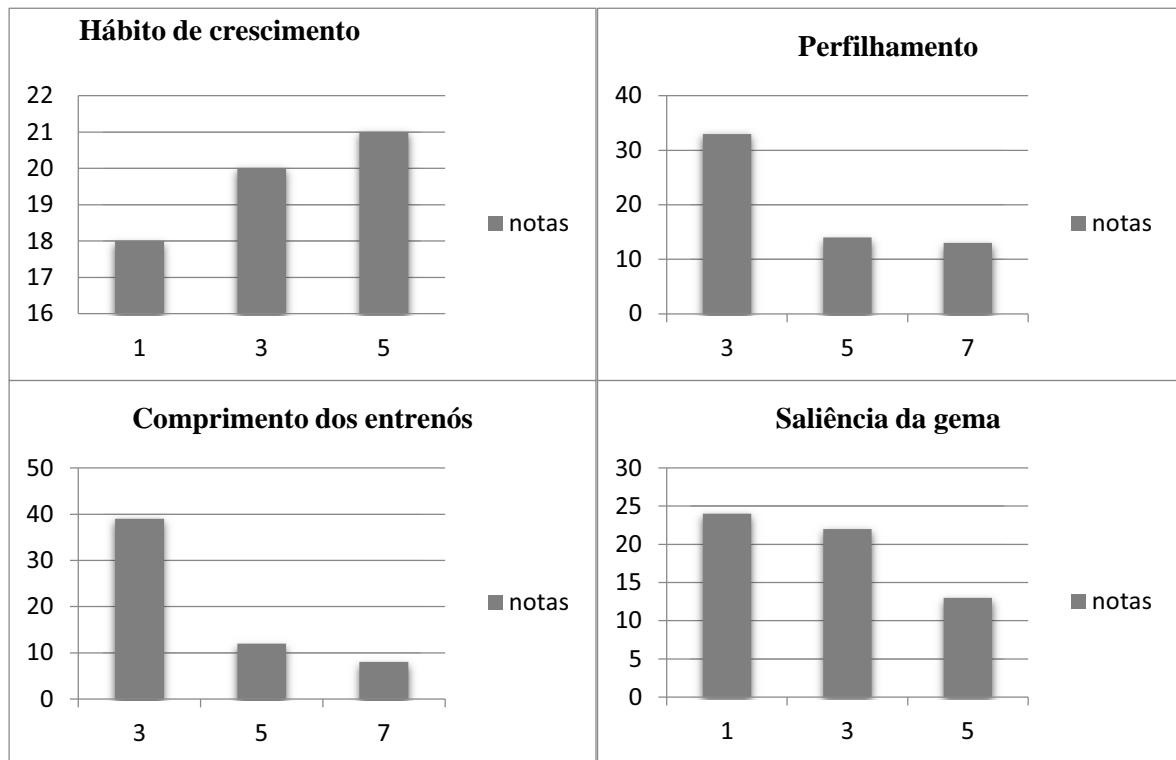


Figura 1 – Distribuição dos caracteres morfológicos dos acessos do Complexo *Saccharum*

Atributos de qualidade e de produção

De acordo com a análise de variância e Teste F, o efeito de bloco, não foi significativo para os atributos analisados, exceto para o peso de 10 canas (PC10) e para números de colmos (COLMOS) na cana planta ($P < 0,05$), o que indica que alguns blocos podem ter melhores condições que outros influenciando, portanto, o peso e o número de colmos (Tabela 2). O efeito genótipo encontrado entre os acessos foi altamente significativo ($p < 0,01$) para todas as características analisadas nas duas épocas de avaliação. Os coeficientes de variação observados neste trabalho indicam uma boa qualidade do experimento, exceto para números de colmos e peso de 10 canas. Segundo Pimentel Gomes (1985), coeficientes de variação de ordem 10 a 20%, garantem uma boa precisão experimental em dados dependentes dos stands. Altos valores de coeficientes de variação (CV) para o parâmetro número de colmos é

comumente encontrado na literatura. Leite (2010) encontrou resultados semelhantes em seus estudos com número de colmos, afirmando que estes componentes são fortemente influenciados por flutuações ambientais. Além disso, de acordo com Perecin e Candido (2007) o atributo número de colmos por touceira tem distribuição esperada similar a Poisson, neste caso o CV esperado para o número de colmos seria 24% para cana planta e 16% para cana soca uma vez que este CV em Poisson é calculado da seguinte forma $CV_{\text{esperado}} = \left(\frac{\sqrt{\lambda}}{\lambda}\right) \times 100$ onde λ = média. O aumento de repetições em ensaios desse tipo pode ser uma alternativa viável para a diminuição de altos coeficientes de variação. Além disso, materiais pouco melhorados geneticamente, como os estudados neste trabalho, são considerados mais sensíveis as intempéries ambientais. Acessos mais antigos sofrem maior variação entre blocos mesmo quando realizados experimentos com alta precisão. Isso acontece devido à falta de uniformidade desses materiais que não foram direcionados por nenhum tipo de seleção, dessa forma, no experimento podem existir genótipos altamente influenciados pelo ambiente. Coeficientes de variação mais baixo, 18,88%, foram sugeridos por Khan, Iqbal e Sultan (2007) em seus experimentos com *S. officinarum*. Govindaraj et al (2014), encontraram o CV de 15,72% para número de colmos em seus estudos com *S. spontaneum*. Tanto Khan, Iqbal e Sultan (2007) quanto Govindaraj et al (2014) utilizaram poucos acessos para a realização do experimento limitando a variabilidade apenas a uma espécie (*S. officinarum* ou *S. spontaneum*) o que, sem dúvida, contribui para a diminuição das variações no experimento.

Dados como amplitude e média dos atributos analisados podem ser encontrados na Tabela 3.

O caráter números de colmo apresentou a variação 1 a 97 em cana planta e de 1 a 280 em cana soca (Tabela 3, Figura 2), ainda que a maioria dos indivíduos teve número de colmos variando entre 3 a 23 tanto para cana soca quanto para cana planta. Nair, Balakrishnan e Sreenivasan (2008) relataram em seus trabalhos com híbridos exóticos de cana, o número de colmos variando de 13,8 a 17,0. Esse valor aproxima -se da média sugerida nesse trabalho. Kashif e Khan (2007) relataram uma amplitude de 7.3 a 10 colmos em seus estudos com *S. officinarum*.

Tabela 2 - Análise de variância de cana planta e cana soca para os componentes de produção: diâmetro de colmos, peso médio dos colmos, altura do colmo e número de colmos

Causa de Variação	Colmos		DMC (mm)		A (m)		PC10 (kg)		Pol (%)		Brix		Fibra (%)	
	CP	CS	CP	CS	CP	CS	CP	CS	CP	CS	CP	CS	CP	CS
bloco	5,65*	0,46 ^{ns}	1,18 ^{ns}	1,44 ^{ns}	1,07 ^{ns}	2,41 ^{ns}	3,26*	1,58 ^{ns}	1,54 ^{ns}	1,78 ^{ns}	1,23 ^{ns}	2,10 ^{ns}	0,21 ^{ns}	1,74 ^{ns}
Genótipo	5,80**	9,81**	12,90**	16,95**	2,66**	5,25**	7,53**	10,69**	18,65**	22,09**	16,01**	18,50**	11,21**	22,60**
CV (%)	54,14	59,37	13,01	11,34	24,8	18,06	31,24	28,93	11,37	12,17	11,39	12,5	8,74	8,51

Colmos: número de colmos, DMC: Diâmetro do colmo, A: Altura média da parcela, PC10: peso de dez canas; CP: cana planta; CS: cana soca; CV: coeficiente de variação; *Significância a nível de 5%; **Significância a nível de 1%; ns: não significativo (Teste F).

Tabela 3 – Amplitude e Média dos atributos analisados em cana planta e cana soca.

Características Agronômicas	Amplitude		Média	
	CP	CS	CP	CS
Nº de colmos	1-97	1-280	17.1	36.5
Diâmetro médio do colmo (mm)	8,9- 39,6	7,7-40,4	22.9	22.4
Altura média (m)	0,2-2,5	0,3-3,3	1.5	1.8
Peso de dez colmos (Kg)	1-20,6	0,76-24,2	7.1	7.9
Pol (%)	1,9-17,3	0,81-16,8	10.6	9.3
Brix	2,9-20,6	1,2-19,7	12.9	10.9
Fibra (%)	10,7-23,4	8,9-25,7	14.7	12.8

CP: cana planta; CS: cana soca;

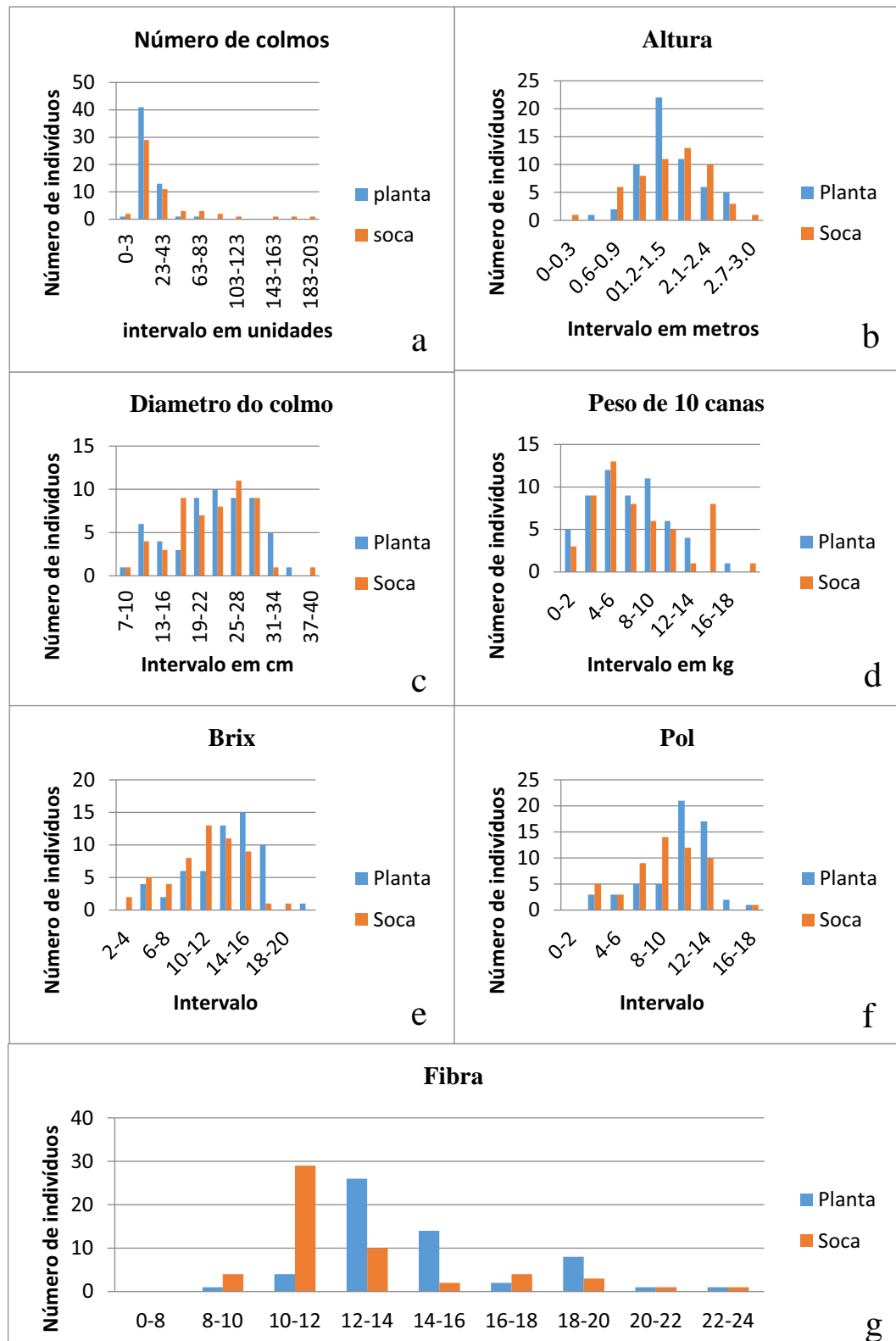


Figura 2 - Distribuição de freqüência dos componentes de componentes de produção: a) altura da touceira, b) número de colmos por parcela, c) diâmetro médio de 10 colmos, d) peso de 10 colmos; e parâmetros de qualidade: e) Brix, f) Pol e g) Fibra) em cana planta e soca.

A grande amplitude no número de colmos encontrada entre os acessos do Complexo *Saccharum* se deve a diversidade de acessos e principalmente a presença de acessos de *S. spontaneum* que apresentam grande capacidade de perfilhamento e rebrota sendo esse fato evidentemente visível na cana-soca.

Em relação à altura média da touceira (Tabela 3, Figura 2), para cana planta, houve uma variação de 0,2 a 2,5 m de maneira que a maioria dos acessos apresentou altura entre 1,2 e 1,5 m. Em cana soca a variação foi de 0,3 a 3,3 m sendo que a maioria dos acessos encontraram-se entre 1,8 e 2,1 m de altura. Esse elevado crescimento da cana soca pode ser explicado pelas condições climáticas mais favoráveis ocorridas no período de crescimento. Nos experimentos de Todd et al. (2014), em Miami com acessos selvagens de cana a variação de altura da média da touceira foi de 0,71 a 1,74 m com média de 1,43. Nos dados de Nair, Balakrishnan e Sreenivasan (1998) a variação na altura das plantas foi de 2,06 a 3,7m. Para Kashif e Khan (2007) a amplitude da altura encontrada nos acessos de *S. officinarum* estudados foi de 0,98 a 1,49. Nos trabalhos com *S. spontaneum* de Govindaraj et al (2014), a altura variou de 0,9 a 1,75. A diferença entre os valores extremos encontrados por esses autores citados quando comparado com os dados aqui apresentados e com os trabalhos de Todd et al. (2014) se deve ao fato de Nair, Balakrishnan e Sreenivasan (1998) utilizarem materiais híbridos, que possivelmente passaram por seleção, Govindaraj et al (2014) utilizarem somente acessos de *S. spontaneum* e Kashif e Khan (2007) utilizarem somente acessos de *S. officinarum*. Nos dados aqui produzidos, os acessos que apresentaram baixa altura tiveram forte influência ambiental seja ela por meio de estresse abióticos, como a falta de chuva, até ataque por pragas. O clima diferenciado do Brasil, assim como, a diversidade dos acessos deste trabalho podem explicar os resultados pouco semelhante aos trabalhos anteriormente citados.

Para diâmetro do colmo, a variação em cana planta foi de 8,9 a 39,6 mm, sendo que a maioria dos acessos apresentou diâmetro médio ente 22 e 25 milímetros para este mesmo período (Tabela 3, Figura 2). Em cana soca, a variação de diâmetro foi de 7,7 a 40,4 mm sendo a maioria dos acessos enquadrados na classe de 25 a 28 milímetros. De acordo com Todd et al. (2014), o maior valor de diâmetro ocorrido em seus trabalhos foi de 25,81 milímetros e a média entre as medidas 23,34 milímetros. Para Nair et al. (1998), acessos híbridos antigos tiveram variação de diâmetro de 19

a 24 milímetros. Esses valores sugeridos são próximo aos encontrados para a maioria dos acessos aqui estudados.

O peso de 10 canas variou entre 1 e 20,6 kg em cana planta e de 0,76 a 24,2 kg em cana soca, sendo que a maioria dos genótipos teve seu peso variando de 4 a 6 kg em ambos os períodos de corte (Tabela 3, Figura 2). Nos trabalhos de Nair, Balakrishnan e Sreenivasan (1998) com híbridos exóticos a variação desse caractere foi de 9 a 12 kg. Nair e Sreenivasan (1992) em seus estudos com germoplasma de *S. officinarum* encontraram valor médio de 8 quilos. Neste caso, também a variabilidade existente entre os acessos desse trabalho gerou uma variação de peso maior do que as sugeridas pelos autores anteriores.

Os atributos Pol e Brix decaíram de uma época de avaliação para outra, como já era esperado (Tabela 3, Figura 2). Os dados de Pol em cana planta variaram entre 1,9 a 17,3(%) sendo que a maioria dos genótipos apresentou valor de Pol entre 10 a 12% neste ciclo de corte. Para cana soca o valor variou de 0,81 a 16,8% e a maioria dos acessos tiveram valores entre 8 e 10% para esta característica neste período. O Brix para cana planta variou de 2,9 a 20,6 em cana planta e de 1,2 a 19,7 em cana soca. Para o ciclo período, a maioria dos indivíduos tiveram o Brix variando de 14 a 16 enquanto no segundo ciclo esse valor variou de 10 a 12. Para Nair, Balakrishnan e Sreenivasan (1998), o parâmetro Pol variou de 14,5 a 17,8 enquanto o Brix variou de cerca de 14, a 19,1, ambos os valores são próximos aos sugeridos neste trabalho. Para Kashif e Khan (2007), os acessos de *S. officinarum* de seus estudos apresentaram o Pol variando de 18,1 a 19,2 e o Brix entre variou de 17 a 20,2. Para Nair e Sreenivasan (1992) para *S. officinarum* a média obtida do Pol foi de 15,4 e do Brix, 17,8. Os dados sugeridos por esses autores apresentam valores próximos aos aqui relatados

Apesar de o aumento na magnitude da amplitude da característica conteúdo de fibra de cana planta para cana soca (10,7 a 23,4 para planta e 8,9 a 25,7 para soca), a maioria dos indivíduos em cana planta apresentaram 12 a 14% de fibra em sua composição enquanto em cana soca de 10 a 12% do seu conteúdo em fibra.

Em relação ao Teste-T de comparação de médias dos parâmetros estudados (Apêndice 1) alguns genótipos merecem destaque. O genótipo SES205A se destacou dos demais na cana planta sendo estatisticamente diferenciado como o maior produtor de colmos neste período de plantio. Para o diâmetro médio do colmo e peso de dez

colmos, o acesso MZ151 foi diferenciado estatisticamente dos demais em cana soca. Nos trabalhos de Todd et al. (2014), acessos de *S. officinarum* foram caracterizados como possuidores de maior diâmetro de colmo entre todos os acessos do banco de germoplasma de Miami, sendo essa diferença mantida em vários períodos do ano. Segundo os autores ainda entre os acessos estudados os de *S. spontaneum* são os que apresentam menor diâmetro, esta informação é corroborada pelos dados sugeridos no Apêndice 1. De acordo com Ferreira et al. (2007) dados como diâmetro e número de colmos são ideais para a escolhas de famílias com elevada produção agrícola. De acordo com Aitken et al (2008) e Milligan et al (1990) o diâmetro de colmos é considerado uma informação importante para os estudos de comportamento em campo dos materiais sendo mais efetivo que a característica, comprimento haste, em relação a determinação do peso dos colmos, independentemente da idade da cultura. Além disso, os mesmos autores afirmam que a seleção para aumento do teor de sacarose deve enfatizar o aumento da concentração de colmos.

O genótipo Badila apresentou o maior valor de Pol e maior Brix entre todos os acessos estudados mostrando média ajustada diferenciada estatisticamente dos demais acessos, tanto em cana planta como em cana soca. Para fibra merece destaque o acesso de *Erianthus*, 72II09, em cana soca. Grande número de acessos de *S. officinarum* estão entre os maiores produtores de Pol e Brix enquanto os acessos de *Erianthus* e *S. spontaneum* apresentaram baixo valor destes parâmetros. Para fibra, as melhores médias foram encontradas entre acessos de *Erianthus* e *S. spontaneum* sendo que acessos de *S. officinarum* apresentaram baixo valor desta característica.

Informações como as relatadas acima são de grande importância para o melhoramento de cana.

Seleção de modelos para a análise de agrupamento e dos componentes principais

Para cada caráter avaliado, foi selecionado o melhor modelo, dado pela combinação das matrizes de variância e covariância genética ($VCOV_G$) e residual ($VCOV_R$). Como existe um número limitado de parâmetros que pode ser estimado a partir de um experimento, se a seleção de modelos for feita primeiramente em relação à $VCOV_R$, poderá haver restrição no número de modelos que poderiam ser testados

para seleccionar a matriz $VCOV_G$, o que não seria interessante, uma vez que em programas de melhoramento genético, a variação genética é prioritária em relação à variação residual. Assim, para cada carácter, optou-se por seleccionar a matriz $VCOV_G$ previamente à matriz $VCOV_R$,

Desse modo, após testar diversos modelos de matrizes de variâncias e covariâncias associadas aos efeitos aleatórios de genótipos ($VCOV_G$), o modelo indicado como sendo o melhor, pelos os critérios AIC e BIC, foi coincidente para todos os caracteres. De acordo com os resultados, a matriz $VCOV_G$ associada aos efeitos de genótipos combina matriz identidade para blocos e uma matriz não-estruturada para cortes. Isso significa que existe heterogeneidade de variâncias entre os efeitos de genótipos em função de cortes, bem como existe correlação dentro de genótipos entre cortes.

Em seguida, procedeu-se a seleção entre modelos de matrizes variâncias e covariâncias residuais $VCOV_R$, feita com base no critério AIC, uma vez que nem sempre os critérios AIC e BIC foram concordantes em termos de seleção de modelos, fazendo-se necessário optar por um deles. Para altura de plantas, a matriz $VCOV_R$ combinou matriz identidade associada aos efeitos cortes e matriz diagonal associada aos efeitos de blocos, indicando que há heterocedasticidade entre efeitos residuais em função dos blocos.

No caso dos carácter número de colmos, a matriz $VCOV_R$ combinou matriz identidade associada aos efeitos de blocos e matriz não-estruturada referente aos efeitos de cortes, o que significa que houve heterogeneidade de variâncias residuais em função dos cortes e que há correlação de efeitos residuais entre cortes. O mesmo padrão foi observado para o carácter peso de dez colmos.

Para os demais caracteres, a matriz $VCOV_R$ combinou de matrizes identidades associadas a efeitos de blocos e de cortes, podendo-se assumir que homogeneidade de variância residual e independência entre resíduos.

Assim, para cada carácter, a partir dos modelos selecionados, dados pela combinação de $VCOV_G$ e $VCOV_R$, foram obtidos os BLUPs dos acessos e BLUEs das testemunhas, os quais foram utilizados nas análises de agrupamento e de componentes principais.

Análise de agrupamento

Em relação á estimativa da distância euclidiana, a média encontrada entre acessos foi 55,8. A menor distância euclidiana observada entre pares de genótipos (4,03) ocorreu entre os acessos NG2117 e IJ76418 Red, enquanto a maior (180,22) entre os genótipos Badila e 72II09. De acordo dendrograma (Figura 3) gerado pelo método UPGMA, é possível notar a formação de dois grandes grupos: o primeiro (G1) composto por US 57-141-5, Cana Alho, IJ76-293, Krakatau, IS 76-155, IN 84-88, 72II09, 57NG-12, IN84-82, IN84-58, SES205A e o segundo (G2), contendo todos os demais genótipos. O grupo G1 é formado, em sua maioria, por indivíduos de espécies diferentes de *S. officinarum*, incluindo acessos de *S. spontaneum*, *S. robustum* e *Erianthus*. Considerando a distância euclidiana média como ponto de corte no dendrograma, três subgrupos estão incluídos em G1: G1.A (US 57-141-5, Cana Alho, IJ76-293, Krakatau, IS 76-155, IN 84-88), G1.B (72II09, 57NG-12) e G1.C (IN84-82, IN84-58, SES205A). O grupo G1.A é formado por acessos de *S. officinarum*, *S. robustum* e *S. spontaneum*. O subgrupo G1.B é formado pelas espécies *Erianthus* com um exemplar da espécie de *S. robustum*. O subgrupo G1.C engloba apenas acessos de *S. spontaneum*. Quatro subgrupos são formados também em G2 sendo G2.A (NG 21-17, IJ76-418 Red, Zapilota, Badila de Java, T2, IJ76-560, Uba-Demerara, IJ76-326, IS 76-116, IN84-106, NG57-213, IJ76-325, NG57-6, NG2121, NG5750, RP8, Sac offc. 8276, Formosa, White transparente, Sac offc. 8284, Pitu, IN84-105), G2.B (T1, Ganda Cheni, Chin, US851008 e Chunnee), G2.C (Lousiana Sempeol, Caiana, IJ76313, IM76229, IJ76566, MZT151, NG7718, Caiana Verdadeira, IJ76-317, Fuji 19, Sabura, Manteiga, Caiana Fita, Caiana Riscada, Ajax, IN84126, Ceram Red e NG57-221) e G2.D (Badila). O acesso Badila apresentou a maior diferenciação dos demais.

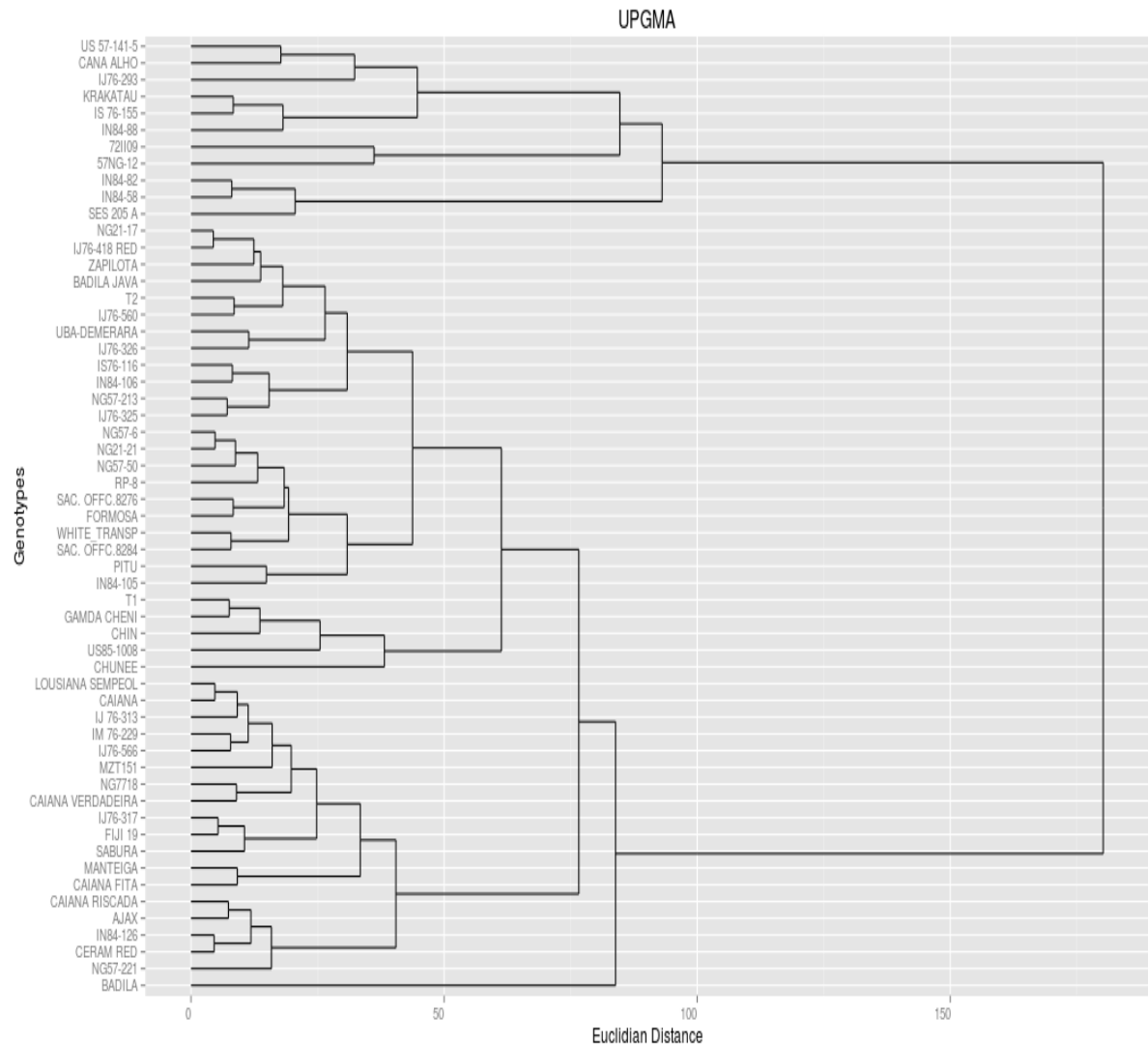


Figura 3-Dendrograma da análise de agrupamento UPGMA utilizando a distância Euclidiana para os caracteres agrônômicos: altura das plantas (A), número de colmos (NCT), diâmetro médio de colmos (DM), peso de dez colmos (PC10), brix no caldo (grau brix), peso de bolo úmido (PBU, t ha⁻¹), conteúdo de fibra no bagaço (F, %), pol na cana (%) e conteúdo de açúcares totais recuperáveis por tonelada de cana

De acordo com o dendrograma (Figura 3) gerado pelo método UPGMA, a menor distância entre os indivíduos ocorreu entre acessos de mesma espécie (*S. officinarum*) e pode ser explicada pela pouca variabilidade existente em termos fenotípicos. A maior distância observada foi entre os acessos Badila e 721109, o que pode ser explicado pelas diferenças morfológicas entre esses indivíduos que são pertencentes a gêneros diferentes. O acesso Badila é tipicamente um exemplar de *S. officinarum*, caracterizado pela grande quantidade de açúcar e pelo maior

diâmetro dos colmos, enquanto o indivíduo 721109 é pertencente ao gênero *Erianthus* caracterizado pelo seu baixo porte, colmos de diâmetro mais finos, baixa quantidade de açúcar e alto teor de fibra.

O grande contraste entre os diversos genótipos (Figura 3) pode estar relacionado com as diferenças fisiológicas e morfológicas entre acessos de diferentes gêneros e espécies existente no experimento. Espécies como *S. spontaneum* e *Erianthus* apresentam grande quantidade de perfilhos quando comparados aos demais indivíduos. Apesar do número limitado de acessos diferentes de *S. spontaneum* no experimento, foi possível observar diferentes subgrupos. Mesmo diante dos poucos estudos relacionados a dados agronômicos nesta espécie (*S. spontaneum*), é possível observar uma determinada diversidade fenotípica entre os genótipos que permitem a separação dos mesmos em diversos grupos (GOVINDARAJ et al., 2014). O mesmo fato pode ser observado em relação a *S. officinarum*. Apesar de os acessos dessa espécie serem considerados menos diversos entre si, no presente trabalho foi possível observar uma quantidade considerável de subgrupos em *S. officinarum*. Essa informação corroborada os resultados de Nair e Sreenivasan (1992) que estudaram caracteres agronômicos para acessos dessa espécie de diferentes regiões do mundo. Segundo os autores, a diversidade de *S. officinarum* é evidente até mesmo dentro de grupos geográficos, uma vez que acessos oriundos de uma mesma região apresentam indivíduos alocados em diferentes grupos geográficos, sendo essa informação válida também para genótipos de regiões onde acredita-se que a cana foi originada.

Além disso, fatores biológicos podem atuar de maneira diferente nos diversos acessos e espécies do Complexo *Saccharum*, por exemplo, danos causados por estresse biótico e abiótico (como ocorrência de secas, ataques de formigas e cigarrinha) em genomas mais antigos (mais suscetíveis) como por exemplo acessos os de *S. officinarum* podem afetar diretamente o crescimento e, conseqüentemente, a altura da planta, gerando valores muito contrastantes mesmo entre acessos de mesma espécie alocando-os separadamente.

Componentes principais

De acordo com os resultados os dois primeiros componentes principais foram explicaram cerca de 83% da variação observada entre genótipos avaliados (Figura 4, Tabela 4). O primeiro componente principal (CP1) reteve 66,2% da variância original (Figura 4, Tabela 4, Tabela 5), sendo que os caracteres ATRt, Pol, DM, Brix e PC10 correlacionam-se positivamente com este eixo ($0,3080 \leq \hat{r} \leq 0,3710$), enquanto Fibra, PBU e Colmos correlacionam-se negativamente com o mesmo ($-0,3744 \leq \hat{r} \leq -0,3272$), ou seja, genótipos alocados à direita nesse eixo como *S. officinarum* 8276, *S. officinarum* 8284, Badila e White Transparent apresentam maior concentração de açúcar, peso e diâmetro médio de colmos e menores concentração de fibras, peso de bolo úmido e número de colmos, ao contrário de genótipos alocados à esquerda em relação a esse eixo, como SES205, IM84-58, 72II09, Krakatau, IN84-82, IS76-155, que têm baixa concentração de açúcares (ATRt, Pol, Brix), colmos mais finos e leves, embora em maior número, altos PBU e teor de fibra. A característica altura das plantas pouco influenciou na distinção dos genótipos (Tabela 5) em relação a esse eixo. Com exceção da altura das plantas, pouco correlacionada com esse eixo, os demais caracteres apresentam correlações com magnitudes similares em relação ao mesmo eixo. O caráter altura de planta, que pouco influencia a distribuição dos genótipos em relação ao CP1 ($\hat{r} = -0,0796$), é o que apresenta a maior correlação, em termos de magnitude, com CP2, ($\hat{r} = -0,7325$). O caráter DM é o único que se correlaciona positivamente com esse eixo ($\hat{r} = 0,2129$). Genótipos localizados na parte inferior do gráfico tendem a apresentarem touceiras mais altas, como Badila e IN84-105, ao contrário de acessos como Ceram Red, Ajax, IJ76313 e Cana Fita, entre outros, que merecem destaque por apresentarem menor porte.

Tabela 4 – Valores das porcentagens das variâncias observadas entre os genótipos, desvio padrão e proporção cumulativa explicada por cada componente principal.

Componentes	CP1	CP2	CP3	CP4	CP5	CP6	CP7	CP8	CP9
Desvio-padrão	2,4414	1,2202	0,9607	0,6032	0,4594	0,1958	0,1195	0,0148	1,0156.10 ⁻³
Proporção da variância	0,6623	0,1654	0,1025	0,0404	0,0235	0,0043	0,0016	2,4310.10 ⁻⁴	1,1461.10 ⁻⁷
Proporção cumulativa	0,6623	0,8277	0,9303	0,9707	0,9941	0,9984	≈ 1	≈ 1	1

Tabela 5 - Correlação entre as variáveis e os componentes principais (CP). Sendo as variáveis: altura das plantas, número de colmos, diâmetro médio de colmos (DM), peso de dez colmos (PC10), brix no caldo (%), peso de bolo úmido (PBU), conteúdo de fibra no bagaço (%), pol na cana (%) e conteúdo de açúcares totais redutores por tonelada de cana.

	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6	PC7	PC8	PC9
Altura	-0.0796	-0.7325	-0.3363	0.1282	-0.4840	-0.3024	-0.0425	-0.0052	-0.0005
Colmos	-0.3272	-0.3214	-0.1638	0.3908	0.7783	-0.0405	0.0521	-0.0043	0.0001
DM	0.3513	0.2129	-0.3779	-0.2847	0.2687	-0.7233	-0.1096	-0.0096	-0.0007
PC10	0.3080	-0.1821	-0.5822	-0.3865	0.1483	0.5888	0.1222	0.0046	0.0005
Brix	0.3363	-0.3139	0.4141	-0.1572	0.1200	-0.1512	0.7441	-0.0347	-0.0004
PBU	-0.3743	-0.1552	0.1555	-0.5366	0.0861	-0.0482	-0.1194	-0.0002	0.7069
Fibra	-0.3744	-0.1549	0.1554	-0.5362	0.0863	-0.0469	-0.1192	0.0116	-0.7073
Pol	0.3705	-0.2595	0.2835	0.0102	0.1350	0.0818	-0.4696	-0.6851	-0.0058
ATRt	0.3710	-0.2602	0.2797	0.0124	0.1353	0.0550	-0.4072	0.7274	0.0060

Os caracteres positivamente correlacionados com o componente principal 1 (CP1) estão interligados com a alta produção de açúcar, enquanto os que apresentam correlação negativa estão associados à baixa quantidade de açúcar e alta presença de fibras. Santchurn et al. (2012) encontraram resultados semelhantes em relação a correlação negativa entre teor de sacarose estimado (Brix e Pol) e fibra, e entre o diâmetro da cana e número de colmos. Os genótipos que se concentram no lado esquerdo desse eixo, como IN84-82, IN84-58, SES 205 A, Krakatau, 72II09 e IS76-155 e que pertencem ao primeiro grupo (G1) do dendrograma obtido com distância euclidiana, são em sua maioria acessos de *S. spontaneum* (IN84-82, IN84-58, SES 205A, Krakatau), que notoriamente apresentam pouca quantidade de açúcar, além do acesso de *Erianthus* (72II09) e um único indivíduo de *S. officinarum* (IS76-155). O acesso IS76-155 indicou um comportamento diferente do esperado. Apesar de se tratar de uma espécie classificada como *S. officinarum* este indivíduo apresentou características semelhantes a *S. spontaneum*. Portanto, neste caso, para esse

acesso, pode ter ocorrido um erro na classificação do material, ou troca do mesmo durante os procedimentos de manutenção realizado no banco de germoplasma.

A maioria dos acessos de *S. officinarum*, bem como híbridos mais antigos e as variedades modernas usadas como testemunha concentram-se na área direita do gráfico. Esses materiais são caracterizados pela alta concentração de açúcar em seus colmos bem como altura e diâmetro do colmo relativamente maiores quando comparados a exemplares de *Erianthus* e *S. spontaneum*. Em campo, foi possível observar que o genótipo Ceram Red foi altamente suscetível a doenças. Essa pouca resistência a estresses bióticos e abióticos dos acessos mais antigos a campo também tem dificultado a manutenção dos mesmos nos bancos de germoplasma, acarretando no aumento dos cuidados e gastos para a perpetuação dos mesmos.

Informações contidas no gráfico podem ser importantes na escolha de genitores para futuros cruzamentos, buscando incrementar diferentes características nas novas variedades. O posicionamento dos diferentes acessos pode sugerir futuras combinações de genitores.

Dutra Filho et al. (2011) comentam que estudos deste tipo em cana-de-açúcar são de grande eficiência na escolha de genótipos divergentes para futuro cruzamentos, uma vez que permitem a visualização mais simples de dados agrupados facilitando a sugestão de genitores de alta performance para futuros cruzamentos e contribuindo para a menor degenerescência varietal dessa espécie.

Programas de melhoramento que dispõem de análises moleculares poderão usar esses dados para apoiar as informações obtidas na análise multivariada. Características observadas no campo atreladas às informações de diversidade genética entre os acessos poderão permitir, no futuro, cruzamentos mais promissores e efetivos, economizando custos e tempo nos programas de melhoramento genético.

Conclusão

A caracterização fenotípica de genótipos do Complexo *Saccharum* permitiu diferenciar os diversos acessos. Acessos de *S. spontaneum* e *Erianthus* apresentaram comportamento diferenciado em todas as análises de dados fenotípicos. O Componente Principal 1 (CP1) tem valores positivos para atributos relacionados á produção de açúcar, enquanto o Componente Principal 2 (CP2) é fortemente

influenciado pela altura. A análise fenotípica de acessos selvagens pode favorecer a compreensão dos procedimentos ideais realizáveis *ex situ* para a manutenção dos acessos nos bancos.

Referências Bibliográficas

AITKEN, K.; HERMANN, S.; KARNO, K.; BONNETT, G.; MCINTYRE, L.; JACKSON, P. Genetic control of yield related stalk traits in sugarcane. **Theoretical and applied genetics**, v. 117, n. 7, p. 1191-1203, 2008.

AKAIKE, H. A new look at the statistical model identification. **Automatic Control, IEEE Transactions on**, v. 19, n. 6, p. 716-723, 1974.

ALVAREZ, I. A., CASTRO, P. R. C. Crescimento da parte aérea de cana crua e queimada. **Scientia Agricola**, v. 56, n. 4, p. 1069-1079, 1999.

BRESSIANI, J. A. **Seleção sequencial em cana-de-açúcar**. 159 p. Tese (Doutorado em Agronomia- Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2001.

CONSECANA, Conselho nacional dos produtores de cana-de-açúcar, açúcar e álcool do estado de São Paulo. **Manual de instruções** – CONSECANA-SP. Editora CONSECANA, Piracicaba, 112p. 2006

DUTRA FILHO, J. D.; DE MELO, L. J. O. T.; RESENDE, L. V.; ANUNCIÇÃO FILHO, C. J.; BASTOS, G. Q. Aplicação de técnicas multivariadas no estudo da divergência genética em cana-de-açúcar. **Revista Ciência Agronômica**, v. 42, n. 1, p. 185-192, 2011.

ECKERMANN, P. J.; VERBYLA, A. P.; CULLIS, B. R.; THOMPSON, R. The analysis of quantitative traits in wheat mapping populations. **Crop and Pasture Science**, v. 52, n. 12, p. 1195-1206, 2001.

FERNANDES, A. C. **Cálculos na Agroindústria da Cana-de-Açúcar. Manual.** 193p., 2000.

FERREIRA, F. M.; BARROS, W. S.; SILVA, F. D.; BARBOSA, M. H. P.; CRUZ, C. D.; BASTOS, I. T. Relações fenotípicas e genotípicas entre componentes de produção em cana-de-açúcar. **Bragantia**, v. 66, n. 4, p. 605-610, 2007.

FLECK, M. P.; BOURDEL, M. C. Método de simulação e escolha de fatores na análise dos principais componentes. **Rev Saúde Pública**, v. 32, p. 267-72, 1998.

GABRIEL, K. R. The biplot graphic display of matrices with application to principal component analysis. **Biometrika**, v. 58, n. 3, p. 453-467, 1971.

GOVINDARAJ, P.; AMALRAJ, V.; MOHANRAJ, K.; NAIR, N. Collection, Characterization and Phenotypic Diversity of *Saccharum spontaneum* L. from Arid and Semi Arid Zones of Northwestern India. **Sugar Tech**, v. 16, n. 1, p. 36-43, 2014.

IAC, INSTITUTO AGRONÔMICO DE CAMPINAS -. Sistema de multiplicação de cana-de-açúcar com uso de mudas pré-brotadas (MPB), oriundas de gemas individualizadas. Boletim Técnico. Disponível em: <http://www.iac.sp.gov.br/publicacoes/porassunto/cana.php>. Acesso em: 25 de março de 2014.

KASHIF, M.; KHAN, F. A. Divergence in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) based on yield and quality traits. **Pak. J. Bot**, v. 39, n. 5, p. 1559-1563, 2007.

KHAN, F. A.; IQBAL, M. Y.; SULTAN, M. Morphogenetic behavior of some agronomic traits of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). **Pak. J. Agri. Sci**, v. 44, n. 4, p. 669-671, 2007.

LAVANHOLI, M. Qualidade da cana-de-açúcar como material-prima para produção de açúcar e álcool. IN: DINARDO-MIRANDA, L.L.; DE VASCONCELOS, A.C.M.; LANDELL, M.G.A. . **Cana-de-açúcar**. 1. ed. Campinas: Instituto Agrônomo, 2008.

LEITE, D. C. **Identificação de marcadores microssatélites genômicos e funcionais associados a parâmetros agroindustriais em cana-de-açúcar**. 2010, 68f. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Área de Concentração em Genética e Melhoramento de Plantas) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

MANCINI, M. C. **Mapeamento genético e identificação de marcadores AFLP, microssatélites genômicos e funcionais associados a parâmetros agroindustriais em cana-de-açúcar**. 2010, 98f. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Área de Concentração em Genética e Melhoramento de Plantas) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

MANLY, B. F. **Multivariate statistical methods: a primer**. 3rd Ed. Florida: Chapman & Hall / CRC. 215pp. 2004.

MILLIGAN, S.; GRAVOIS, K.; BISCHOFF, K.; MARTIN, F. Crop effects on genetic relationships among sugarcane traits. **Crop Science**, v. 30, n. 4, p. 927-931, 1990.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Descritores mínimos de cana-de-acucar (*Saccharum* sp.)**. Disponível em: http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/CANA%20FORMULARIO_2012_P.doc. Acesso: 2 jan. 2011.

NAIR, N. V.; BALAKRISHNAN, R.; SREENIVASAN, T. V. Variability for quantitative traits in exotic hybrid germplasm of sugarcane. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 45, n. 5, p. 459-463, 1998.

NAIR, N. V.; SREENIVASAN, T. V. A study on the diversity of *Saccharum officinarum* L. germplasm. **The Indian Journal of Genetics and Plant Breeding**, v. 52, n.1, p. 39-44, 1992.

NETO, J. M. M.; MOITA, G. C. Uma introdução à análise exploratória de dados multivariados. **Química Nova**, v. 21, n. 4, p. 467-469, 1998.

PASTINA, M.; MALOSETTI, M.; GAZAFFI, R.; MOLLINARI, M.; MARGARIDO, G.; OLIVEIRA, K.; PINTO, L.; SOUZA, A.; VAN EEUWIJK, F.; GARCIA, A. A mixed model QTL analysis for sugarcane multiple-harvest-location trial data. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 124, n. 5, p. 835-849, 2012.

PAYNE, R.W., MURRAY, D.A., HARDING, S.A., BAIRD, D.B., SOUTAR, D.M. **An Introduction to GenStat for Windows (14th Edition)**. VSN International, Hemel Hempstead, UK. 2011.

PERECIN, D., CANDIDO, L. S. **Experimentação e estatística**. In: Material didático. p.43, 2007.

PIMENTEL GOMES, F. **Curso de estatística experimental**. 11. Ed. Piracicaba:ESALQ, 467p., 1985.

R CORE TEAM. **R: A language and environment of statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://R-project.org/>. 2013.

SANTCHURN, D.; RAMDOYAL, K.; BADALOO, M. G. H.; LABUSCHAGNE, M. From sugar industry to cane industry: investigations on multivariate data analysis techniques in the identification of different high biomass sugarcane varieties. **Euphytica**, v. 185, n. 3, p. 543-558, 2012.

SAS Institute. **SAS/STAT 9.2 user's guide**. SAS Institute, Cary, NC, USA, 2008.

SCHWARZ, G. Estimating the dimension of a model. **The annals of statistics**, v. 6, n. 2, p. 461-464, 1978.

SNEATH, P. H.; SOKAL, R. R. **Numerical taxonomy. The principles and practice of numerical classification**. H. Freeman and Co., San Francisco. 573 pp. 1973.

TODD, J.; WANG, J.; GLAZ, B.; SOOD, S.; AYALA-SILVA, T.; NAYAK, S. N.; GLYNN, N. C.; GUTIERREZ, O. A.; KUHN, D. N.; TAHIR, M. Phenotypic characterization of the Miami World Collection of sugarcane (*Saccharum* spp.) and related grasses for selecting a representative core. **Genetic Resources and Crop Evolution**, p. 1-16, 2014.

UNICA, UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE- AÇÚCAR. **CONSECA**. Disponível em: <http://www.unica.com.br/consecana/>. Acesso em: 18 de setembro de 2014.

VERBYLA, A. P.; ECKERMANN, P. J.; THOMPSON, R.; CULLIS, B. R. The analysis of quantitative trait loci in multi-environment trials using a multiplicative mixed model. **Crop and Pasture Science**, v. 54, n. 12, p. 1395-1408, 2003.

VICINI, L.; SOUZA, A. M. Análise multivariada da teoria à prática. **Santa Maria: UFSM, CCNE**, 215p. 2005.

APENDICE 1

Tabela 1A -Comparação de médias entre acessos de cana-de-açúcar pelo Teste T (LSD) referente a altura média da touceira em cana planta e cana soca. * Médias com a mesma letra não são significativamente diferentes; AM: médias ajustadas da altura média da touceira.

Teste T – Cana Planta			Teste T – Cana Soca		
AM	Genótipo		AM	Genótipo	
A	2.3	IN8482	A	2.9	BADILA
A-B	2.3	T1	A-B	2.5	IN8482
A-C	2.3	T2	A-B	2.4	T1
A-D	2.2	BADILA	A-B	2.4	IM76-229
A-E	2.1	IN84105	A-B	2.4	IN8488
A-E	2.1	MANTEIGA	B-C	2.3	CANAALHO
A-F	2	NG576	B-C	2.3	NG576
A-G	1.9	CHUNEE	B-C	2.3	IN8458
A-G	1.9	NG2121	B-C	2.2	NG2121
A-G	1.8	CANAALHO	B-C	2.2	KRAKATAU
A-G	1.8	NG5750	B-C	2.2	UBADEMERARA
A-G	1.8	IN8488	B-C	2.2	IJ76293
A-H	1.8	IJ76293	B-D	2.1	T2
A-H	1.8	IM76-229	B-E	2.1	IN84105
B-I	1.7	RP8	B-F	2.1	CHUNEE
B-J	1.7	IJ76326	B-G	2	RP8
B-J	1.7	SACOFFC8276	B-G	2	US571415
C-J	1.7	IN8458	B-H	2	IS76155
D-K	1.6	SACOFFC8284	B-I	2	72II09
D-K	1.6	IJ76566	B-I	2	NG5750
E-K	1.6	US851008	B-J	1.9	57NG12
E-K	1.5	IJ76418RED	B-J	1.9	CHIN
E-M	1.5	NG2117	B-J	1.9	US851008
E-M	1.5	PITU	B-J	1.9	IJ76418RED
E-M	1.5	WHITETRASPAREN	B-J	1.9	MZ151
E-M	1.5	GAMDACHENI	B-K	1.8	NG2117
E-M	1.5	KRAKATAU	C-K	1.8	WHITETRASPAREN
E-M	1.5	IJ76317	C-K	1.8	IJ76326
E-M	1.5	CAIANAFITA	C-K	1.7	SABURA
E-M	1.5	SES205A	C-K	1.7	SACOFFC8276

Continuação...

Tabela 1A -Comparação de médias entre acessos de cana-de-açúcar pelo Teste T (LSD) referente a altura média da touceira em cana planta e cana soca. * Médias com a mesma letra não são significativamente diferentes; AM: médias ajustadas da altura média da touceira.

Teste T – Cana Planta		Teste T – Cana Soca	
AM	Genótipo	AM	Genótipo
E-M 1.5	LOUSIANASEMP	C-K 1.7	SES205A
E-M 1.5	NG7718	C-K 1.7	FIJI19
E-M 1.5	IJ76560	C-K 1.7	GAMDACHENI
E-M 1.4	FORMOSA	D-K 1.6	SACOFFC8284
E-M 1.4	CHIN	D-K 1.6	PITU
E-M 1.4	CAIANA	E-K 1.6	IJ76317
E-M 1.4	FIJI19	F-K 1.5	MANTEIGA
E-N 1.3	UBADEMERARA	G-L 1.5	NG57221
E-N 1.3	CAIANARISCADA	G-L 1.4	IJ76325
E-N 1.3	US571415	G-L 1.4	IJ76566
E-N 1.3	IJ76325	H-L 1.4	NG57213
E-N 1.3	SABURA	H-L 1.4	BADILAJAVA
E-N 1.3	CAIANEVERDADEIR	I-L 1.4	FORMOSA
F-N 1.3	57NG12	J-L 1.3	CAIANA
G-N 1.2	IN84106	J-L 1.3	IJ76560
L-N 1.2	AJAX	J-L 1.2	LOUSIANASEMP
L-N 1.2	IS76116	J-M 1.2	CAIANAFITA
L-N 1.1	ZAPILOTA	K-M 1.1	NG7718
L-N 1.1	NG57213	K-M 1.1	IN84126
L-N 1.1	IN84126	L-M 1.1	IJ76313
L-N 1.1	NG57221	L-M 1	CAIANARISCADA
L-N 1.1	MZ151	L-M 0.9	AJAX
L-N 1.1	IS76155	L-M 0.9	IN84106
L-N 1.1	72II09	M 0.2	CERAMRED
L-N 1	BADILAJAVA		
M-N 0.8	CERAMRED		
N 0.7	IJ76313		

Tabela 2A – Comparação de médias entre acessos de cana-de-açúcar pelo Teste T (LSD) referente ao número de colmo touceira em cana planta e cana soca. * Médias com a mesma letra não são significativamente diferentes; NC= médias ajustadas do número de colmos

Teste T- Cana Planta			Teste T- Cana Soca		
	NC	Genotipo		NC	Genotipo
A	75.4	SES205A	A	185.0	IN8458
B	57.0	IN8482	A-B	173.0	SES205A
C	37.7	IN8458	B	147.0	IN8482
C	36.3	CHUNEE	C	103.7	IS76155
C-D	34.3	US851008	C	102.0	KRAKATAU
C-D	34.0	IS76155	C-D	87.3	IN8488
C-D	34.0	IJ76293	C-E	81.7	CHUNEE
C-D	33.7	IN8488	C-E	79.3	US571415
C-D	33.0	KRAKATAU	C-F	68.7	72II09
C-E	29.0	CANAALHO	D-G	58.7	US851008
C-F	28.0	T1	D-H	54.6	57NG12
C-G	27.7	IN84105	F-H	47.7	T1
C-G	26.0	T2	F-H	40.7	IN84105
C-G	24.7	CHIN	F-H	37.7	CHIN
C-H	24.0	IJ76326	F-H	35.5	GAMDACHENI
D-I	20.3	RP8	F-H	34.0	CANAALHO
D-I	18.7	WHITETRANSPARENT	G-H	32.7	IJ76293
D-I	18.6	57NG12	G-H	31.0	T2
F-I	17.7	PITU	G-H	28.0	UBADEMERARA
F-I	17.7	SACOFFC8284	G-H	27.0	IJ76326
F-I	17.7	UBADEMERARA	G-H	25.7	NG2121
F-I	17.3	NG576	G-H	24.7	RP8
F-I	15.0	NG5750	H	23.3	SACOFFC8284
F-I	14.7	NG2121	H	22.7	PITU
F-I	14.7	GAMDACHENI	H	22.3	NG5750
F-I	14.3	BADILA	H	21.0	BADILA
F-I	14.0	US571415	H	20.7	WHITETRANSPARENT
G-I	13.0	IJ76560	H	16.3	SABURA
G-I	12.3	72II09	H	15.3	NG576
G-I	12.3	BADILAJAVA	H	15.1	FIJI19
G-I	11.7	IJ76317	H	15.0	IJ76317
G-I	11.3	LOUSIANASEMP	H	13.1	IJ76566
G-I	11.3	SABURA	H	12.3	IJ76418RED
G-I	11.1	IJ76566	H	11.7	SACOFFC8276
I-H	11.0	IJ76325	H	11.3	IJ76560
I-H	8.6	MANTEIGA	H	10.0	IM76-229
I-H	8.6	NG2117	H	8.6	AJAX
I-H	8.3	SACOFFC8276	H	8.3	BADILAJAVA
I-H	8.3	CAIANA	H	7.7	IJ76313
I-H	8.3	FORMOSA	H	7.6	NG57221
I-H	8.1	CERAMRED	H	6.9	NG2117
I-H	8.0	IN84106	H	6.3	IN84106
I	8.0	IJ76418RED	H	6.0	LOUSIANASEMP
I	7.3	NG57221	H	5.8	IN84126
I	6.3	NG57213	H	5.6	CAIANARISCADA
I	6.3	IJ76313	H	4.9	CERAMRED
I	6.0	IN84126	H	4.8	IJ76325
I	6.0	IS76116	H	4.3	NG57213
I	6.0	CAIANARISCADA	H	4.3	MZ151
I	5.9	CAIANAFITA	H	4.0	CAIANA
I	5.3	FIJI19	H	3.6	MANTEIGA
I	5.0	IM76-229	H	3.5	NG7718
I	4.7	AJAX	H	3.3	FORMOSA
I	4.3	ZAPILOTA	H	3.3	CAIANAFITA
I	4.0	NG7718			
I	3.3	MZ151			
I	-0.2	CAIANEVERDADEIRA			

Tabela 3A – Comparação de médias entre genótipos de cana-de-açúcar pelo Teste T (LSD) referente ao diâmetro médio do colmo em cana planta e cana soca. * Médias com a mesma letra não são significativamente diferentes; DM= médias ajustadas do diâmetro médio dos colmos

Teste T – Cana Planta			Teste T- Cana Soca		
DM		Genótipo	DM		Genótipo
A	35.2	MANTEIGA	A	37.8	MZ151
A-B	32.2	CAIANAFITA	B	31.2	IJ76313
A-B	31.9	IJ76313	B-C	30.9	BADILAJAVA
A-C	31.4	MZ151	B-C	30.5	SABURA
A-C	31.2	RP8	B-D	30.1	AJAX
A-C	31	AJAX	B-D	30	RP8
A-C	29.9	IJ76317	B-D	29.5	T2
B-C	29.7	FIJI19	B-E	29.3	IM76-229
B-D	29.1	T1	B-F	29	CAIANAFITA
B-E	28.9	IJ76566	B-F	28.8	MANTEIGA
B-E	28.8	IM76-229	B-F	28.1	FIJI19
B-E	28.8	T2	B-F	28	NG576
B-E	28.5	SABURA	B-F	27.9	BADILA
B-E	28.5	LOUSIANASEMP	B-F	27.8	WHITETRANSPARENT
B-F	28.1	BADILAJAVA	B-F	27.5	SACOFFC8284
B-G	27.6	WHITETRANSPARENT	C-G	27	T1
B-G	26.9	SACOFFC8284	C-H	26.8	IJ76317
B-G	26.9	FORMOSA	C-I	26.1	IJ76566
B-G	26.8	CERAMRED	D-I	25.8	NG2121
C-H	26.6	SACOFFC8276	D-J	25.2	SACOFFC8276
C-I	26.1	CAIANA	D-J	25.1	IN84126
C-J	25.5	CAIANARISCADA	E-J	24.9	NG57221
C-K	25.3	BADILA	E-J	24.9	CAIANA
C-K	25.3	NG576	E-J	24.7	FORMOSA
C-L	24.8	CAIANAVERDADEIR	F-J	24.4	LOUSIANASEMP
D-L	24.7	NG5750	F-J	24.3	NG5750
D-L	24.6	IN84126	F-J	23.7	IJ76326
D-L	24.6	IJ76560	F-J	23.3	CAIANARISCADA
D-L	24.6	IN84105	G-K	22.8	IJ76560

Continua....

Tabela 3A – Comparação de médias entre genótipos de cana-de-açúcar pelo Teste T (LSD) referente ao diâmetro médio do colmo em cana planta e cana soca. * Médias com a mesma letra não são significativamente diferentes; DM= médias ajustadas do diâmetro médio dos colmos

Teste T – Cana Planta			Teste T – Cana Planta		
DM	Genótipos		DM	Genótipos	
D-L	24.1	IN84106	H-L	22.2	IN84106
E-L	24.1	NG2121	I-L	21.9	IN84105
E-L	23.5	NG57221	I-M	20.7	CERAMRED
F-L	23.5	ZAPILOTA	J-M	20.4	IJ76325
G-L	22.9	IJ76326	J-M	20.1	UBADEMERARA
H-L	21.5	GAMDACHENI	J-M	20	PITU
I-L	21.3	NG7718	J-M	19.5	IJ76418RED
J-L	21.3	IJ76325	J-N	19.4	NG2117
J-L	21.2	PITU	K-N	18.2	CHUNEE
J-L	20.9	CHUNEE	K-N	18.1	NG7718
J-M	20.7	UBADEMERARA	K-N	18	GAMDACHENI
K-N	20	IJ76418RED	L-N	17.9	72II09
K-O	20	NG2117	L-N	17.6	US571415
L-O	19.7	IS76116	M-O	17.2	CANAALHO
L-O	18.9	CHIN	M-O	17.2	CHIN
L-O	18.2	NG57213	M-O	16.9	NG57213
M-P	16.1	CANAALHO	M-P	16.2	IJ76293
N-Q	15.2	72II09	N-Q	13.7	IN8488
O-Q	14.8	IJ76293	P-Q	13.3	KRAKATAU
P-Q	13.3	US571415	P-Q	13.2	US851008
P-Q	13.2	KRAKATAU	P-R	12.7	IN8482
P-Q	13	IN8482	P-R	12.3	IS76155
P-Q	12.3	IS76155	Q-R	11.3	SES205A
P-Q	12	IN8488	Q-R	10.5	IN8458
P-Q	11.3	US851008	R	8.2	57NG12
Q	10.9	IN8458			
Q	10.6	57NG12			
Q	10.4	SES205A			

Tabela 4A – Comparação entre diferentes acessos de cana-de-açúcar pelo Teste T (LSD) referente ao peso de dez colmos em cana planta e cana soca. * Médias com a mesma letra não são significativamente diferentes; PC= médias ajustadas do peso de dez colmos.

Teste T – Cana Planta			Teste T – Cana Soca		
PC		Genótipo	PC		Genótipo
A	16.5	T1	A	19.9	MZ151
A	16.4	MANTEIGA	B	15.9	T2
A-B	13.7	T2	B	15.4	RP8
A-C	13.3	RP8	B	15.3	NG576
A-C	13.1	NG576	B	15.3	T1
B-D	12.1	IM76-229	B	15.3	BADILA
B-E	11.5	CAIANAFITA	B-C	15	SABURA
B-E	11.2	IJ76317	B-D	14.6	MANTEIGA
B-E	11.2	BADILA	B-D	14.1	IM76-229
B-E	10.7	SACOFFC8284	B-E	13.2	SACOFFC8276
B-F	10.2	NG2121	C-F	11.5	NG2121
B-G	10	SACOFFC8276	D-G	10.9	SACOFFC8284
B-H	9.9	IJ76566	D-H	10.9	IJ76317
C-H	9.8	SABURA	D-H	10.4	NG5750
C-H	9.6	IN84105	E-H	10.3	WHITETRSPARENT
C-H	9.5	WHITETRSPARENT	E-I	9.6	BADILAJAVA
C-H	9.4	FIJI19	E-J	9.2	FIJI19
D-I	9	MZ151	E-K	9.1	IJ76566
D-I	8.8	LOUSIANASEMP	F-K	9.1	IN84105
D-I	8.7	IJ76325	F-L	8.3	IJ76313
E-I	8.3	IJ76326	F-L	8.1	AJAX
E-I	8.3	FORMOSA	F-L	7.8	FORMOSA
E-I	8.1	AJAX	G-L	7.4	LOUSIANASEMP
E-J	7.7	NG5750	G-L	7.3	UBADEMERARA
E-K	7.6	IJ76313	G-M	7.3	NG57221
E-K	7.4	IJ76418RED	G-M	7.2	IJ76326
E-L	6.8	IN84106	H-N	6.2	CHUNEE
E-L	6.6	US571415	H-N	6.2	CAIANA
E-M	6.6	CAIANEVERDADEIRA	H-O	6	IJ76418RED
F-M	6.6	ZAPILOTA	H-O	5.8	PITU
G-M	6.4	CHUNEE	H-P	5.5	CAIANAFITA
H-M	6.2	BADILAJAVA	I-P	5.4	CANAALHO
H-M	5.9	PITU	I-P	5.1	IJ76325
H-M	5.9	CAIANA	J-P	5.1	CHIN
H-M	5.9	NG57221	J-P	5	US571415
H-M	5.8	NG7718	J-P	5	IJ76293
H-M	5.8	UBADEMERARA	J-P	4.9	IJ76560

Continuação...

Tabela 4A – Comparação entre diferentes acessos de cana-de-açúcar pelo Teste T (LSD) referente ao peso de dez colmos em cana planta e cana soca. * Médias com a mesma letra não são significativamente diferentes; PC= médias ajustadas do peso de dez colmos.

Teste T – Cana Planta			Teste T – Cana Soca		
	PC	Genótipo		PC	Genótipo
H-M	5.7	IJ76560	L-P	4.6	GAMDACHENI
H-M	5.6	CAIANARISC	L-P	4.5	IN84126
H-M	5.5	IN84126	L-P	4.2	IN84106
I-M	4.9	NG2117	L-P	4.2	72II09
J-M	4.3	GAMDACHENI	L-P	4.1	NG57213
J-M	3.9	CERAMRED	L-P	3.6	NG7718
K-M	3.8	CANAALHO	L-P	3.6	IN8482
K-M	3.7	CHIN	L-P	3.4	IN8488
K-M	3.6	NG57213	L-P	3.1	NG2117
K-M	3.5	IS76116	M-P	3.1	CAIANARISCADA
L-M	3.5	IN8482	N-P	3	KRAKATAU
L-M	3.1	IJ76293	N-P	2.4	IS76155
L-M	3	72II09	N-P	2.3	US851008
L-M	2.7	IN8488	N-P	2.2	SES205A
M	2.4	KRAKATAU	O-P	2	IN8458
M	1.9	SES205A	O-P	0.8	CERAMRED
M	1.8	IS76155	P	0.6	57NG12
M	1.7	US851008			
M	1.6	IN8458			
M	1.1	57NG12			

Tabela 5A – Comparação de médias entre acessos de cana-de-açúcar pelo Teste T (LSD) referente ao pol em cana planta e cana soca. * Médias com a mesma letra não são significativamente diferentes; P= médias ajustadas do Pol.

Teste T – Cana Planta			Teste T – Cana Soca		
	P	Genótipo		P	Genótipo
A	17.1	BADILA	A	16.6	BADILA
B	14.4	T1	B	13.7	T1
B-C	14.2	PITU	B	13.4	IN84105
B-C	14	T2	B-C	13.2	NG576
B-C	14	IN84105	B-C	13.2	T2
B-C	13.9	NG5750	B-D	12.9	SACOFFC8276
B-C	13.8	FORMOSA	B-D	12.9	NG2121
B-C	13.7	IJ76325	B-E	12.6	NG5750
B-C	13.5	NG2121	B-F	12.5	RP8
B-D	13.4	WHITETRANSPARENT	B-G	12.2	PITU
B-E	13.2	NG576	B-G	12.1	WHITETRANSPARENT

Continuação...

Tabela 5A – Comparação de médias entre acessos de cana-de-açúcar pelo Teste T (LSD) referente ao pol em cana planta e cana soca. * Médias com a mesma letra não são significativamente diferentes; P= médias ajustadas do Pol.

Teste T – Cana Planta			Teste T – Cana Soca		
P	Genótipo		P	Genótipo	
B-F	13.1	RP8	C-H	11.5	NG57213
B-F	13	LOUSIANASEMP	C-H	11.4	UBADEMERARA
B-G	12.8	NG57213	C-I	11.4	NG2117
B-G	12.7	CAIANA	C-I	11.2	IJ76325
B-G	12.6	SACOFFC8284	D-I	11.2	SACOFFC8284
C-G	12.4	IS76116	D-I	11.2	CHUNEE
C-H	12.3	IJ76317	D-I	11	IJ76326
C-H	12.2	IJ76326	D-I	10.9	BADILAJAVA
C-I	12.1	IM76-229	E-I	10.8	FIJI19
C-J	11.9	FIJI19	F-I	10.7	SABURA
C-J	11.8	SACOFFC8276	G-J	10.4	IN84106
C-K	11.6	BADILAJAVA	H-J	10.1	IJ76418RED
C-K	11.6	IJ76313	H-J	10	CHIN
C-K	11.5	IN84106	H-J	9.9	IJ76317
D-K	11.3	IJ76566	H-K	9.8	FORMOSA
E-K	11.3	GAMDACHENI	I-K	9	MZ151
E-K	11.1	CHIN	I-M	9	IJ76560
E-K	11	ZAPILOTA	I-M	8.9	CAIANA
F-K	10.9	IN84126	I-N	8.9	IJ76566
G-K	10.9	IJ76560	I-N	8.8	LOUSIANASEMP
G-K	10.9	SABURA	I-N	8.8	IJ76313
G-K	10.6	IJ76418RED	I-N	8.7	IM76-229
G-K	10.6	NG7718	I-O	8.6	CERAMRED
G-K	10.4	CAIANARISCADA	J-O	8.4	US851008
G-L	10.3	MANTEIGA	J-O	8.1	AJAX
G-L	10.3	MZ151	J-P	8	CAIANAFITA
G-L	10.2	CAIANEVERDADEIR	L-P	7.8	GAMDACHENI
H-L	10.2	NG2117	L-P	7.3	CAIANARISCADA
I-L	10.2	US851008	L-P	7.3	MANTEIGA
J-K	10.1	CHUNEE	M-P	7	IN84126

Continuação...

Tabela 5A – Comparação de médias entre acessos de cana-de-açúcar pelo Teste T (LSD) referente ao pol em cana planta e cana soca. * Médias com a mesma letra não são significativamente diferentes; P= médias ajustadas do Pol.

Teste T – Cana Planta			Teste T – Cana Planta		
	P	Genótipo		P	Genótipo
K-M	9.8	AJAX	M-P	7	IJ76293
K-M	9.8	UBADEMERARA	M-P	6.9	CANAALHO
K-N	9.5	CERAMRED	M-P	6.9	NG7718
L-N	8.2	NG57221	N-P	6.7	NG57221
L-O	8.1	CAIANAFITA	O-P	6.3	US571415
M-O	7.9	57NG12	P-Q	5.5	57NG12
N-O	7.4	US571415	Q-R	4.3	IN8488
N-P	6.6	CANAALHO	Q-R	4.2	IN8482
O-Q	6.5	IJ76293	Q-S	3.9	IN8458
O-Q	6.1	IN8488	Q-S	3.7	SES205A
P-R	5.3	IN8458	R-S	3.3	IS76155
Q-S	4.5	IN8482	R-S	2.7	KRAKATAU
R-S	4.5	IS76155	S	2.1	72II09
R-S	3.7	KRAKATAU			
R-S	3.6	SES205A			
R-S	3	72II09			

Tabela 6A – Comparação de médias entre acessos de cana-de-açúcar pelo Teste T (LSD) referente ao brix em cana planta e cana soca. * Médias com a mesma letra não são significativamente diferentes; B= médias ajustadas do brix.

Teste T – Cana Planta			Teste T- Cana Soca		
	B	Genótipo		B	Genótipo
A	20.3	BADILA	A	19.5	BADILA
B	17.5	PITU	B	16	T1
B	17.2	T1	B	15.8	IN84105
B	17.1	IN84105	B-C	15.6	NG576
B-C	16.8	FORMOSA	B-D	15	T2
B-D	16.8	IJ76325	B-D	14.9	NG2121
B-D	16.8	NG5750	B-E	14.9	NG5750
B-E	16.3	NG2121	B-F	14.7	RP8
B-E	16.3	T2	B-F	14.6	SACOFFC8276
B-F	16.2	WHITETRANSPARENT	B-F	14.4	PITU
B-G	16	RP8	B-G	14.1	NG57213
B-G	15.7	NG576	B-H	13.8	WHITETRANSPARENT

Continuação...

Tabela 6A – Comparação de médias entre acessos de cana-de-açúcar pelo Teste T (LSD) referente ao brix em cana planta e cana soca. * Médias com a mesma letra não são significativamente diferentes; B= médias ajustadas do brix.

Teste T – Cana Planta		Teste T- Cana Soca	
B	Genótipo	B	Genótipo
B-H 15.6	NG57213	C-I 13.7	NG2117
B-H 15.6	LOUSIANASEMP	C-I 13.6	IJ76325
B-H 15.4	CAIANA	C-I 13.5	UBADEMERARA
B-H 15.3	IS76116	D-I 13.3	CHUNEE
B-H 15	SACOFFC8284	D-I 12.9	SACOFFC8284
B-H 14.9	IJ76326	D-I 12.8	IJ76326
B-H 14.7	IJ76317	D-I 12.7	BADILAJAVA
B-I 14.6	SACOFFC8276	E-J 12.4	FIJI19
B-J 14.5	IN84106	F-K 12.2	IN84106
C-J 14.4	IM76-229	G-K 12.2	SABURA
C-J 14.4	BADILAJAVA	G-K 11.9	CHIN
C-J 14.3	FIJI19	H-K 11.8	IJ76418RED
D-J 14.1	IJ76313	H-K 11.5	FORMOSA
E-J 14.1	GAMDACHENI	I-K 11.4	IJ76317
E-J 13.9	CHIN	I-L 10.6	IJ76560
E-J 13.6	IJ76566	I-L 10.4	MZ151
F-J 13.6	IJ76560	I-L 10.3	CAIANA
F-J 13.5	ZAPILOTA	I-M 10.2	US851008
G-J 13.4	IN84126	I-M 10.2	LOUSIANASEMP
H-J 13.1	US851008	I-N 10.1	IJ76566
H-J 12.8	SABURA	I-N 10.1	IJ76313
H-J 12.8	IJ76418RED	I-N 10.1	CERAMRED
H-J 12.6	CAIANARISCADA	J-N 10.1	IM76-229
H-K 12.5	NG7718	L-N 9.5	GAMDACHENI
H-K 12.5	MZ151	L-N 9.4	AJAX
H-K 12.3	CHUNEE	L-N 8.9	CANAALHO
H-L 12.3	NG2117	L-N 8.9	CAIANAFITA
H-M 12.2	CAIANAVEVERDAEIR	L-N 8.8	IJ76293
I-M 12	AJAX	L-N 8.7	CAIANARISCADA

Continuação...

Tabela 6A – Comparação de médias entre acessos de cana-de-açúcar pelo Teste T (LSD) referente ao brix em cana planta e cana soca. * Médias com a mesma letra não são significativamente diferentes; B= médias ajustadas do brix.

Teste T – Cana Planta			Teste T- Cana Soca		
	B	Genótipo		B	Genótipo
I-M	12	MANTEIGA	L-N	8.3	US571415
J-M	11.9	UBADEMERARA	L-N	8.2	MANTEIGA
J-M	11.5	CERAMRED	L-O	8	NG7718
J-M	11.4	57NG12	L-O	8	IN84126
K-N	10.2	NG57221	M-P	7.8	NG57221
K-N	9.9	US571415	N-Q	7.5	57NG12
L-O	9.5	CAIANAFITA	O-R	5.6	IN8482
M-O	8.9	CANAALHO	P-R	5.5	IN8488
N-O	8.3	IJ76293	P-R	5.3	IN8458
N-Q	8.2	IN8488	Q-S	4.8	SES205A
O-R	7.2	IN8458	Q-S	4.2	IS76155
P-S	6	IN8482	R-S	3.5	KRAKATAU
Q-S	5.9	IS76155	S	3	72II09
R-S	5	SES205A			
R-S	4.9	KRAKATAU			
S	4.2	72II09			

Tabela 7A –Comparação de médias entre acessos de cana-de-açúcar pelo Teste T (LSD) referente a fibra em cana planta e cana soca. * Médias com a mesma letra não são significativamente diferentes; F= médias ajustadas da fibra.

Teste T – Cana Planta			Teste T – Cana Soca		
	F	Genótipo		F	Genótipo
A	23	57NG12	A	23.3	72II09
A-B	21.9	72II09	B	20.9	57NG12
B-C	19.9	SES205A	B-C	19.5	IN8458
C	19.3	US571415	B-C	19.5	IN8482
C	19.2	IN8458	C-D	18.5	US571415
C	18.9	IN8488	D-E	17.5	SES205A
C	18.9	CANAALHO	D-E	16.8	CANAALHO
C-D	18.6	IN8482	E	16.6	KRAKATAU
C-E	18.2	IS76155	E	16.4	IN8488
C-E	18.2	KRAKATAU	E	15.9	IJ76293

Continuação...

Tabela 7A –Comparação de médias entre acessos de cana-de-açúcar pelo Teste T (LSD) referente a fibra em cana planta e cana soca. * Médias com a mesma letra não são significativamente diferentes; F= médias ajustadas da fibra.

Teste T – Cana Planta			Teste T – Cana Soca		
F	Genótipo		F	Genótipo	
D-F 16.7	IJ76293		E-F 15.7	IS76155	
D-G 16.6	US851008		F-G 13.9	NG57213	
E-G 15.5	IN84106		F-G 13.8	US851008	
F-H 15.3	CHIN		F-G 13.8	GAMDACHENI	
F-H 15.1	GAMDACHENI		F-G 13.6	IJ76325	
F-H 14.8	IJ76560		F-H 13.2	NG2117	
F-H 14.7	BADILAJAVA		G-H 12.5	CHUNEE	
F-H 14.7	SACOFFC8276		G-I 12.4	CHIN	
G-H 14.6	AJAX		G-I 12.3	UBADEMERARA	
G-I 14.5	PITU		G-J 12.1	IN84106	
G-I 14.5	NG57221		G-K 12	CAIANARISCADA	
H-J 14.4	IS76116		G-K 12	PITU	
H-K 14.2	NG57213		G-K 12	IJ76560	
H-K 14.2	IN84105		G-K 11.9	IN84105	
H-K 14.1	RP8		G-K 11.9	NG576	
H-L 14	IN84126		G-K 11.9	NG5750	
H-L 14	UBADEMERARA		G-K 11.7	RP8	
H-L 14	ZAPILOTA		G-K 11.7	FORMOSA	
H-L 14	IJ76325		G-M 11.5	CERAMRED	
H-L 14	IJ76326		H-M 11.5	IJ76418RED	
H-L 13.8	IJ76313		H-M 11.5	BADILA	
H-M 13.7	MZ151		H-M 11.4	IJ76326	
H-M 13.6	FORMOSA		H-M 11.3	AJAX	
H-M 13.6	CHUNEE		H-M 11.3	NG57221	
H-M 13.6	CAIANARISCADA		H-M 11.3	T1	
H-M 13.5	CAIANA		H-M 11	BADILAJAVA	
H-N 13.4	CERAMRED		H-M 10.9	NG2121	
H-N 13.3	NG5750		H-M 10.7	NG7718	
H-N 13.2	NG2121		I-M 10.6	CAIANA	
H-N 13.2	IJ76566		I-M 10.6	LOUSIANASEMP	

Continuação...

Tabela 7A –Comparação de médias entre acessos de cana-de-açúcar pelo Teste T (LSD) referente a fibra em cana planta e cana soca. * Médias com a mesma letra não são significativamente diferentes; F= médias ajustadas da fibra.

Teste T – Cana Soca			Teste T – Cana Soca		
F	Genótipo		F	Genótipo	
H-N	13.2	IJ76418RED	I-M	10.5	IJ76313
H-N	13.1	WHITETRANSSPARENT	I-M	10.5	SACOFFC8284
H-N	12.9	LOUSIANASEMP	I-M	10.5	IN84126
H-N	12.7	CAIANAVERDADEIR	J-M	10.4	MZ151
H-N	12.7	NG2117	J-M	10.4	IJ76317
H-N	12.6	FIJI19	J-M	10.4	IM76-229
H-N	12.6	T1	J-M	10.2	IJ76566
I-N	12.5	IJ76317	J-M	10.1	WHITETRANSSPARENT
J-N	12.4	BADILA	J-M	10.1	FIJI19
J-N	12.4	SACOFFC8284	M	10.1	T2
K-N	12.3	IM76-229	M	9.8	SACOFFC8276
K-N	12.1	NG7718	M	9.7	SABURA
K-N	12	NG576	M	9.4	MANTEIGA
N	11.8	SABURA	M	8.9	CAIANAFITA
N	11.3	T2			
N	11.2	CAIANAFITA			
N	10.9	MANTEIGA			

Capítulo 4 - Teste de diferentes antimitóticos em preparações citológicas de metáfases mitóticas de espécies do gênero *Saccharum*

RESUMO: A cana-de-açúcar possui atualmente um dos genomas mais complexos do reino vegetal. Por apresentar alta ploidia, ocorrência de aneuploidia e cromossomos pequenos, poucos são os estudos relacionados à citogenética dessa espécie sendo, portanto, pouco conhecido o efeito de diferentes antimitóticos nas cultivares atuais. O presente trabalho teve como objetivo verificar a eficiência de diferentes antimitóticos e concentrações na produção de metáfases no cultivar de cana IAC91-1099 e em Krakatau (*S. spontaneum*) bem como um prévio relato do número cromossômico dos mesmos. Para isso, utilizou-se a contagem do número de metáfases produzido pelo uso de colchicina (nas concentrações de 0,05% e 0,1%), 8-hidroxiquinolina (nas concentrações de 0,02% e 0,04%) e a trifuralina (nas concentrações de 3 μ M e 9 μ M). Os três antimitóticos foram eficientes na produção de metáfases, o antimitótico 8-hidroxiquinolina apresentou resultados significativamente melhor quando comparado com os demais. A variação cromossômica do cultivar IAC91-1099 foi de $2n= 90-112$, apresentando maior número de metáfases com $2n=112$ cromossomos. Para o acesso Krakatau, a variação encontrada foi de $2n= 90-129$, sendo $2n= 128$ o número observado com maior frequência.

Palavras-chave: 8-hidroxiquinolina, trifuralina, colchicina, cana-de-açúcar.

Introdução

A cana-de-açúcar nos últimos anos tem se destacado como geradora de divisas para as mais diferentes áreas do globo. Por apresentar um grande número de derivados e pela sua importância efetiva na fabricação de açúcar e dos chamados biocombustíveis, essa espécie tem atraído as atenções das mais diferentes áreas da ciência. Nativa do sudeste da Ásia, a cana-de-açúcar é membro da família Poaceae e do gênero *Saccharum* que inclui seis espécies: *S. officinarum*, *S. spontaneum*, *S.*

robustum, *S. sinense*, *S. barberi* e *S. edule*, sendo as cultivares atuais, híbridos originados de cruzamentos de plantas de *S. officinarum* e *S. spontaneum* (D'HONT et al., 1996, IRVINE, 1999).

Apesar do grande interesse científico atual na espécie, estudos relacionados à descoberta de números cromossômicos de acessos antigos e cultivares atuais de cana-de-açúcar são poucos e relativamente antigos. A dificuldade em relação à análise citogenética em cana-de-açúcar se dá principalmente pelo elevado grau de ploidia associado à alta complexidade do genoma, à presença de aneuploidia e instabilidade cromossômica (GRIVET; ARRUDA, 2002) e a dificuldade na obtenção de uma técnica concisa que facilite a contagem correta do real número cromossômico da espécie (TLASKAL; HUTCHINSON, 1973).

Diferentes métodos de obtenção de alto número de metáfases de qualidade em cana-de-açúcar são descritos por Silvarolla e Aguiar-Perecin (1994) e por D'Hont et al. (1996). Atualmente, se tem observado que cada laboratório tem estabelecido seu próprio método em relação à contagem de números cromossômicos de cana-de-açúcar dificultando, portanto, o conhecimento de novos pré-tratamentos e técnicas de obtenção de boas de qualidade. Uma forma de se padronizar ou estabelecer novos protocolos se dá por meio do uso de diferentes antimitóticos nas preparações citogenéticas. Segundo Guerra e Souza (2002) o antimitótico ideal é aquele que tem a capacidade de bloquear o ciclo mitótico em metáfases provocando a maior contração cromossômica possível, produzindo melhor espalhamento do cromossomo pela destruição ou inibição das fibras do fuso acrométrico.

Entre os antimitóticos usados atualmente merecem destaque: a colchicina, a 8-hidroxiquinolina e a trifuralina.

A colchicina é um produto originalmente extraído de plantas da espécie *Colchicum sativum* sendo, nos dias de hoje, fabricada sinteticamente (MONDIN; DOCHA NETO, 2006). Esse antimitótico bloqueia a formação do fuso em prófase, por meio do impedimento da polimerização proteica, atrasando as separações cromossômicas e facilitando a visualização dos cromossomos metafásicos (ELGSTI; DUSTIN, 1955), podendo ser utilizada na indução de ploidia nos programas de melhoramento genético (quando em altas concentrações) ou para usos farmacêuticos (quando em baixas concentrações), como por exemplo para o tratamento do câncer.

A trifluralina é um herbicida da família das dinitroanilinas utilizado em diversas culturas como soja, citros, e mandioca que age principalmente nas proteínas tubulínicas, despolimerizando os microtúbulos e, dessa forma, impedindo o processo de divisão celular (MOREJOHN; FOSKET, 1991).

A 8-hidroxiquinolina é uma droga da família das quinolinas que promove significativa inativação do fuso impedindo a expansão dos cromossomos seguida de uma contração maior dos mesmos no plano equatorial da célula.

O objetivo deste trabalho foi verificar a eficiência na produção de metáfases de qualidade de diferentes antimitóticos e concentrações na produção de metáfases no cultivar moderna de cana IAC91-1099 (*S. officinarum* x *S. spontaneum*) e Krakatau (*S. spontaneum*), bem como um prévio relato do número cromossômico desses acessos.

Material e Métodos

Para a realização do teste de antimitótico gemas retiradas de diferentes colmos do cultivar IAC91-1099 e do acesso Krakatau foram coletadas no campo de experimentação do Instituto Agronômico de Campinas – Centro de Cana, localizado em Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil e depositadas em bandejas plásticas contendo *Sphagnum* umedecidos com água até a brotação. Optou-se por utilizar esses materiais devido ao fato do cultivar IAC91-1099 ser um material de alta performance para açúcar, sendo encontrado em plantio comercial em diferentes partes do Estado de São Paulo e do Brasil e pelo acesso Krakatau (*S. spontaneum*) devido ao fato desse genótipo apresentar alta capacidade de produção de fibra e biomassa, sendo utilizado em cruzamentos com variedades comerciais para a obtenção de genótipos que agreguem maior quantidade dessas características. As bandejas então permaneceram em câmara de germinação (B.O.D.), com temperatura constante de 35°C (+1,-1), até a obtenção de raízes com até três centímetros de comprimento. Raízes com aparência e tamanhos semelhantes foram coletadas e imediatamente imersas, de forma separada, em cada tipo de antimitótico por 4 horas a temperatura ambiente. Utilizou-se como antimitótico a colchicina em duas diferentes concentrações de 0,1% e 0,05%, a 8-hidroxiquinolina nas concentrações de 0,04% e 0,02% e pôr fim a trifluralina nas concentrações de 3 µM e 9 µM.

Após o pré-tratamento as raízes foram lavadas e fixadas em solução Carnoy (3 etanol: 1 ácido acético glacial) e acondicionadas em geladeira. Essas mesmas raízes passaram por novas lavagens com água destilada, sendo esse material então hidrolisado em HCl 1N a 60°C, por doze minutos. Cada lâmina foi confeccionada com o tecido meristemático de uma raiz que foi macerado sobre a mesma com ácido acético 45%. As lâminas foram coradas por meio da solução de Giemsa 2% por 4 minutos. Para cada antimitótico e para cada concentração do mesmo foram observadas 10 lâminas, sendo anotados os números de pró-metáfases e metáfases observadas, bem como a qualidade visual das mesmas, sendo essas diferenciadas em boa, média e ruim. As metáfases e pró-metáfases consideradas boas apresentavam um alto grau de espalhamento cromossômico e boa condensação cromossômica, as consideradas médias apresentavam boa condensação, porém com cromossomos sobrepostos e por fim as consideradas ruins apresentavam baixo grau de espalhamento cromossômico e baixa condensação cromossômica (modificado de FERRARI, 2010).

Os dados obtidos por meio da observação das metáfases, foram normalizados por meio do uso do logaritmo neperiano, sendo posteriormente realizada a análise de variância e teste de comparação de médias (Teste T - LSD-Least Significant Difference) pelo programa estatístico SAS (SAS Institute, 2008). Após o estabelecimento do melhor tipo e concentração do antimitóticos testados, novas lâminas foram confeccionadas sendo utilizadas para a contagem dos cromossomos 36 metáfases de cada acesso. A nota das metáfases foi ponderada com o número cromossômico encontrado como proposto por Ferrari (2010). Para cada tipo de metáfase foi atribuída uma nota sendo nota 3 as metáfases com boa qualidade, nota 2 as metáfases com qualidade média e nota 1 as metáfases com qualidade ruim. A nota das metáfases foi ponderada com o número cromossômico encontrado, de forma que uma metáfase com nota 3 era contabilizada 3 vezes (ou seja, como 3 contagens desse determinado número cromossômico), enquanto uma metáfase nota 2, era contabilizada como 2 contagens desse número cromossômico. Dados como a moda, a média ponderada das metáfases e a montagem do gráfico da variação cromossômica dos genótipos foram produzidos por meio do uso do programa Excel (Microsoft).

As metáfases foram observadas em microscópio óptico no aumento de 1000x e a contagem cromossômica auxiliada pelo programa IKAROS (Metasystems). As imagens das metáfases foram obtidas por meio da câmera AxioCam ERc 5s (Carl Zeiss) e do programa AxioVision 4.8 (Carl Zeiss Vision).

Resultados e Discussão

Todos os antimitóticos se mostraram eficientes para a obtenção de metáfases no cultivar IAC91-1099, e no acesso de *S spontaneum*, Krakatau, uma vez que não foram observadas fases posteriores à metáfase em nenhuma lâmina analisada. O antimitótico 8-hidroxiquinolina apresentou maior sucesso quando comparado aos outros tratamentos em relação ao número e qualidade das metáfases, mostrando-se significativamente diferente dos demais para ambos os acessos estudados (Tabela 1).

Tabela 1 – Teste T (LSD) para os diferentes antimitóticos no acesso IAC91-1099 e Krakatau

<i>IAC91-1099</i>			<i>Krakatau</i>		
Grupo	Média	Método	Grupo	Média	Métodos
A	2.312	8-hidroxiquinolina	A	2.071	8-hidroxiquinolina
B	1.813	Trifuralina	B	1.795	Trifuralina
B	1.683	Colchicina	B	1.809	Colchicina

* Médias com a mesma letra não são significativamente diferentes ($P > 0.05$)

Apesar de um mesmo tratamento apresentar resultados pouco semelhantes em espécies ou cultivares diferentes (CUCO et al., 2003, SILVAROLLA; AGUIAR-PERECIN, 1994) foi possível notar neste trabalho a eficiência constante do antimitótico 8-hidroxiquinolina para ambos os genótipos.

Para o cultivar IAC91-1099 não ocorreu diferenciação significativa entre as concentrações diferentes de trifuralina e colchicina. Já para a 8-hidroxiquinolina, observou-se uma diferenciação significativa entre as concentrações (Tabela 2) permitindo assim por meio da análise das médias a constatação de um número maior de metáfases na concentração 0,04% desse antimitótico (Tabela 3).

Para o acesso Krakatau não ocorreu diferença significativa entre as concentrações dos 3 tipos de antimetabólitos (Tabela 2) no entanto, o antimetabólito 8-hidroxiquinolina a 0,4% apresentou maior média que os demais antimetabólitos (Tabela 3).

Tabela 2 – Análise de variância das diferentes concentrações do antimetabólitos testados em raízes de IAC91-1099 e Krakatau.

Método	GL	IAC91-1099			Krakatau		
		Quadrado médio	F value	Pr > F	Quadrado médio	F value	Pr > F
8-hidroxiquinolina	1	2.172	33.24	< 0.001	0.071	0.52	0.472
Trifuralina	1	0.031	0.48	0.491	0.219	1.6	0.211
Colchicina	1	0.001	0.03	0.873	0.060	0.44	0.508

Tabela 3 – Média e desvio-padrão normalizados das diferentes concentrações e nos diferentes antimetabólitos testados em raízes de cana-de-açúcar do cultivar IAC91-1099 e Krakatau.

Níveis de concentração	Métodos	N	IAC91-1099		Krakatau	
			Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão
0,0002	8-hidroxiquinolina	10	1,98	0.30	2,01	0.47
0,0004	8-hidroxiquinolina	10	2,64	0.32	2,13	0.52
0,001	Colchicina	10	1,67	0.15	1,86	0.32
0,0005	Colchicina	10	1,69	0.15	1,75	0.21
3	Trifuralina	10	1,85	0.32	1,69	0.17
9	Trifuralina	10	1,77	0.19	1,89	0.38

Por meio da análise das imagens foi possível verificar que tanto para o cultivar IAC91-1099 quanto para Krakatau às metáfases obtidas por meio da 8-hidroxiquinolina se mostraram menos colapsadas sendo, portanto, maior o seu espalhamento pela lâmina quando comparada aos demais antimetabólitos analisados (Figura 1 ,2, 3 e 4).

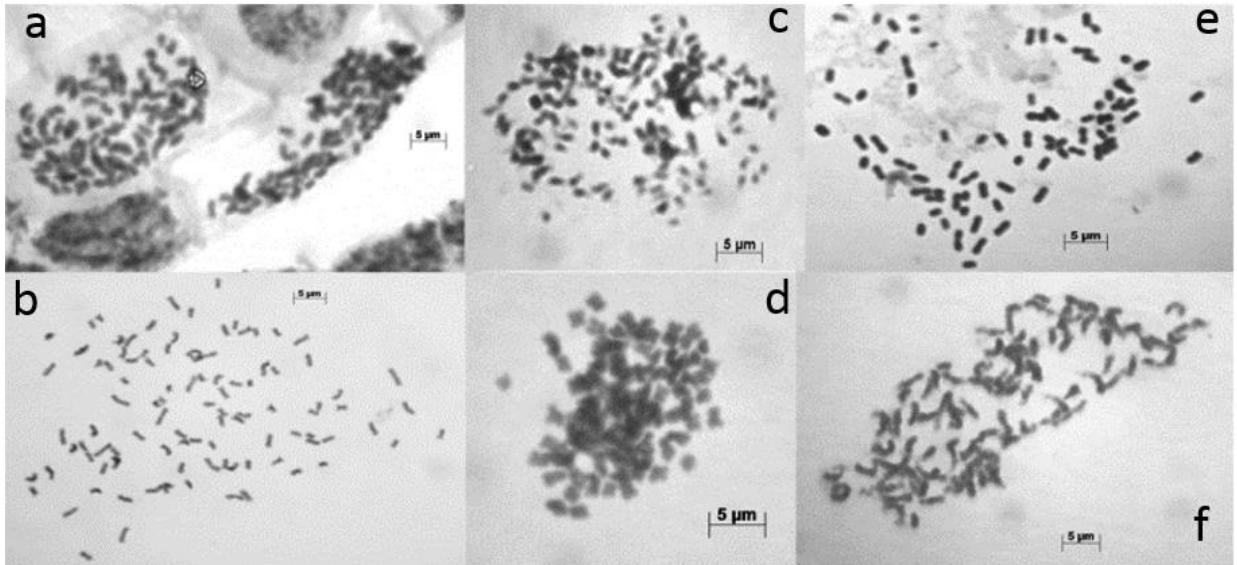


Figura 1- Metáfases ou prometáfases de IAC 91-1099 obtidas pelos seguintes atimitóticos: a) 8-hidroxiquinolina 0,02% b) 8-hidroxiquinolina 0,04% c) colchicina 0,1%, d) trifuralina 3 μ M e) colchicina 0,05%, f) trifuralina 3 μ M.

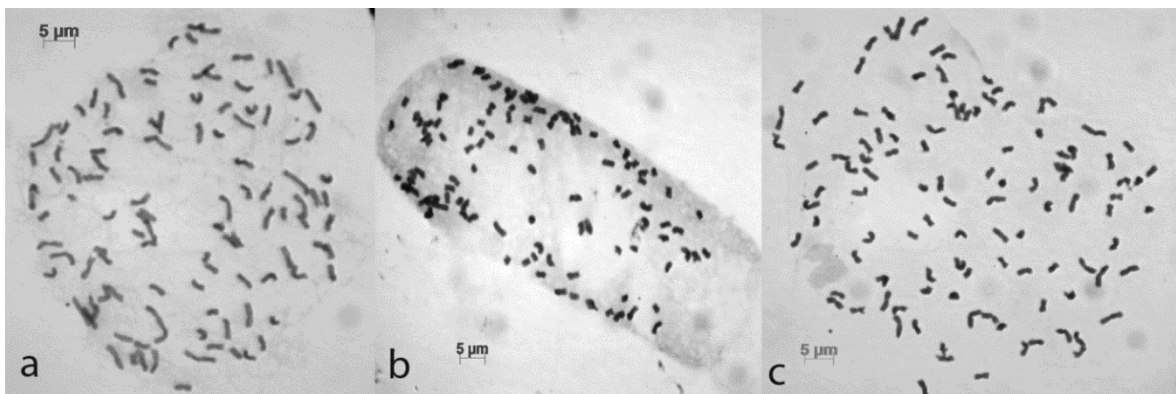


Figura 2- Metáfases mitóticas da cultivar de cana-de-açúcar IAC 91-1099 em 8-hidroxiquinolina 0,04% : a) 2n=112 cromossomos b) 2n=110 cromossomos c) 2n=112 cromossomos.

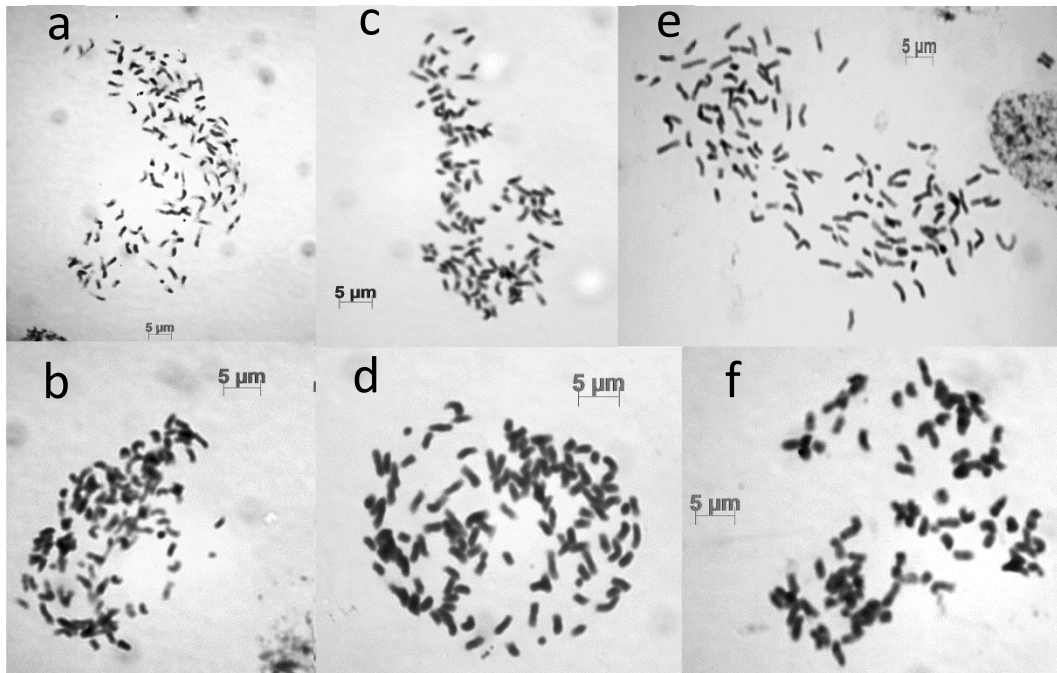


Figura 3- Metáfases ou prometáfases de Krakatau obtidas pelos seguintes antimitóticos: a) colchicina 0,1% b) colchicina 0,05% c) trifluralina 3 μM , d) trifluralina 9 μM e) 8-hidroxiquinolina 0,04% f) 8-hidroxiquinolina 0,02%.

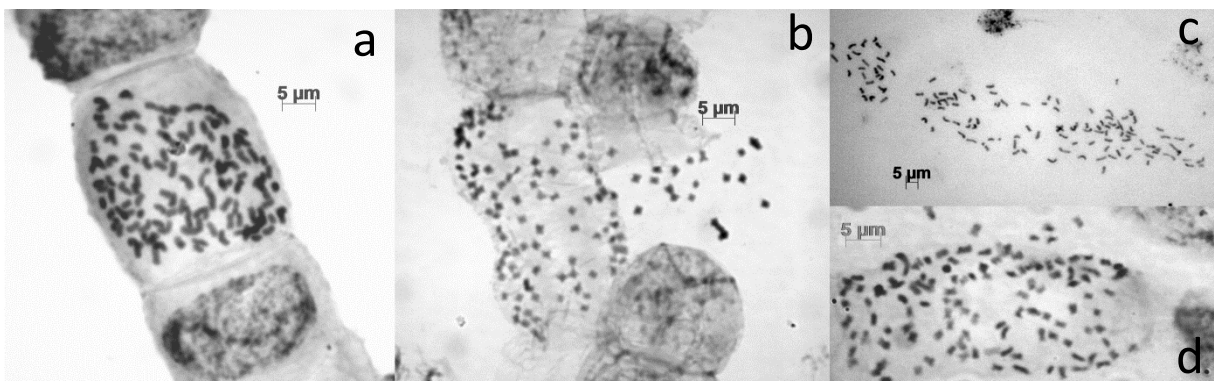


Figura 4- Metáfases mitóticas do clone Krakatau (*S. spontaneum*) em 8-hidroxiquinolina a 0,04%: a) $2n=128$ cromossomos b) $2n=128$ cromossomos c) $2n=128$ cromossomos e d) $2n=96$ cromossomos.

As lâminas produzidas com esse pré-tratamento também mostraram metáfases com graus de condensação similares na mesma lâmina o que pode caracterizar uma maior estabilidade do pré-tratamento. A concentração de 0,04% do antimitótico favoreceu a observação de cromossomos mais definidos quando comparados à concentração menor (Figura 1 e Figura 3) apesar da não diferença estatística para as diferentes concentrações de 8-hidroxiquinolina em Krakatau. A utilização da

concentração menor de 8-hidroxiquinolina neste trabalho, além de um número inferior de metáfases, ocasionou um número maior de pré-metáfases e de finais de prófase quando comparadas com a concentração maior.

O uso da trifuralina como um antimitótico para cana, ainda não foi relatado na literatura. Novos testes com diferentes concentrações e tempo de exposição de trifuralina devem ser realizados no intuito de aperfeiçoar o produto como alternativa de pré-tratamento, uma vez que esse apresenta valor de mercado inferior e menor grau de toxicidade quando comparado a outros antimitóticos (MONDIN;DOCHA NETO, 2006).

O uso da colchicina em pré-tratamentos citogenéticos é muito comum entre animais e vegetais (CARDOSO et al., 2012, GUPTA et al., 2013, BONASORA et al., 2013), no entanto, tem se verificado atualmente entre as espécies vegetais a substituição do mesmo por outros antimitóticos. Silvarolla e Aguiar-Perecin (1994) verificaram uma baixa frequência de metáfases na ação isolada da colchicina em cana-de-açúcar, no entanto, os mesmos verificaram boas preparações quando esse antimitótico era combinado a ciclohexamida. O uso de combinações de diferentes antimitóticos pode tornar os estudos citogenéticos mais onerosos uma vez que certas drogas não são comercializadas em todo o globo ou apresentam ainda alto valor comercial, além de alta toxicidade. O uso de 8-hidroxiquinolina tem sido cada vez mais comum entre as espécies vegetais sendo um possível substituto a colchicina (MONDIN;DOCHA NETO, 2006). Nos estudos citogenéticos em cana-de-açúcar atualmente, a 8-hidroxiquinolina 0,04%, de forma isolada, tem sido amplamente utilizada como verificado nos trabalhos de D'Hont et al. (1995), D'Hont et al. (1996), D'Hont et al. (1998), D'Hont et al. (2002), Cuadrado et al. (2004), Piperidis et al. (2010). Silvarolla e Aguiar-Perecin (1994), que conseguiram um grande número de metáfases com a combinação deste antimitótico com ciclohexamida no cultivar NA56-79. Segundo Cuco et al. (2003), efeitos combinados da 8-hidroxiquinolina e cicloheximida permitem o acúmulo de metáfases e também aumento de prófases finais que podem ser utilizadas na montagem de cariótipos; neste trabalho, comparativamente, esse efeito foi provocado pela concentração menor de 8-hidroxiquinolina. O tempo de 4 horas de exposição das raízes aos antimitóticos revelou bons resultados fato que favorece os estudos citogenéticos uma vez que em um espaço curto de tempo conseguiu-se boas metáfases mitóticas.

Para o acesso IAC91-1099 a variação de número de pró-metáfases e metáfases por lâmina para a 8-hidroxiquinolina a 0,04% foi de 5 a 21, para o mesmo antimitótico a 0,02% foi de 0 a 8, para trifuralina a 9 μM a variação observada foi de 0 a 3, para o mesmo antimitótico a 3 μM a variação foi de 0 a 6, para colchicina 0,1% e 0,05% a variação foi de 0 a 3. Para o acesso Krakatau a variação de número de pró-metáfases e metáfases por lâmina para a 8-hidroxiquinolina a 0,04% foi de 0 a 20, para o mesmo antimitótico a 0,02% foi de 0 a 15, para trifuralina a 9 μM a variação observada foi de 0 a 10, para o mesmo antimitótico a 3 μM a variação foi de 0 a 3, para colchicina 0,1% a variação foi de 0 a 7 e para a colchicina 0,05% a variação foi de 0 a 2.

O coeficiente de variação (CV) dos experimentos foi de 13,2% para os experimentos com a cultivar IAC91-1099 e de 19,6% para os realizados com Krakatau. Esse coeficiente pode ser explicado pela diferença da variação do número de metáfases por lâmina, fator que pode estar ligado às diferentes condições fisiológicas inerentes ao crescimento da raiz. Além disso, os valores obtidos em contagem de células por lâmina apresentam distribuição do tipo "Poisson", em que a média e variância esperadas são iguais (têm os mesmos valores) o que geraria um elevado coeficiente de variação (PERECIN; BARBOSA, 1994).

A variação cromossômica encontrada no cultivar IAC91-1099 foi de $2n=90-112$, sendo a moda $2n=112$ (36% das metáfases), cerca de metade de todas as metáfases analisadas tiveram seu número variando de $2n=110-112$ cromossomos (Figura 2 e Figura 5). Para o acesso Krakatau (*S. spontaneum*) ocorreu a variação do número cromossômico de $2n=90-129$, sendo a moda $2n=128$ (38% das metáfases), o número $2n=96$ cromossomos também foi bastante observado neste genótipo (Figura 4 e Figura 6).

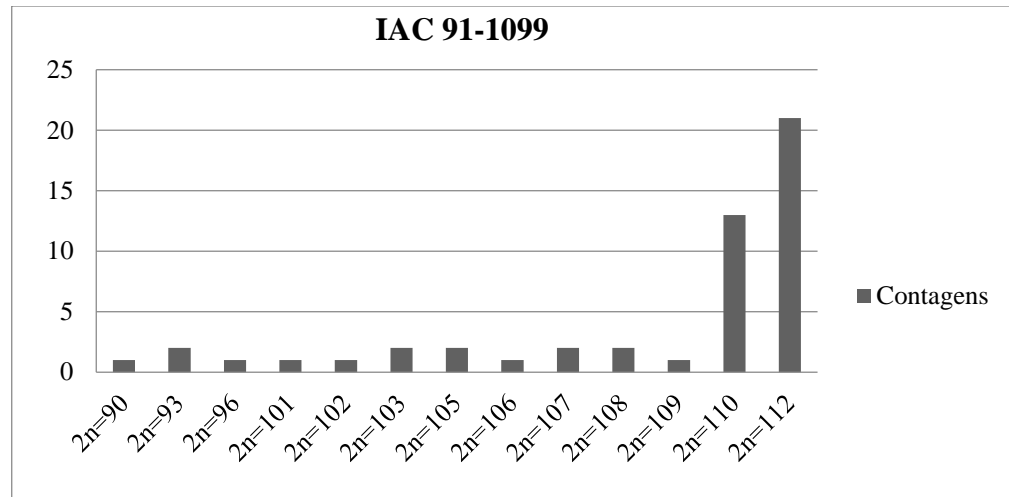


Figura 5 – Variação cromossômica no cultivar de cana-de-açúcar IAC91-1099.

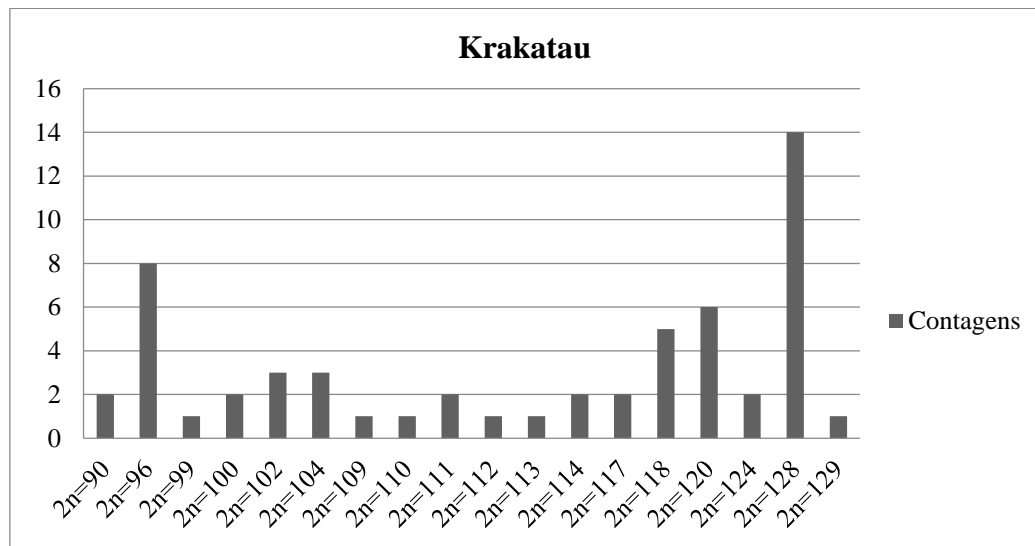


Figura 6 – Variação cromossômica em Krakatau (*S. spontaneum*)

A alta variação no número de cromossomos de cana pode ser explicada pela grande dificuldade em se obter células intactas onde não ocorram perdas de cromossomos na maceração da raiz ou ainda pela interpretação errada de cromossomos sobrepostos (TLASKAL e HUTCHINSON 1973), no entanto, a existência de aneuploidismos não pode ser descartada, uma vez que isto é comum para a espécie. A grande quantidade aliada ao tamanho pequeno e à similaridade dos cromossomos de cana também são fatores que influenciam na análise cromossômica do gênero *Saccharum* (D'HONT, 2005).

Conclusões

Os três antimitóticos foram eficientes para a obtenção de metáfases e o tratamento com 8-hidroxiquinolina mais aconselhável para obtenção de bons resultados para IAC91-1099 e para Krakatau. A variação cromossômica do cultivar IAC91-1099 foi de $2n= 90-112$, apresentando maior número de metáfases com $2n=112$ cromossomos. Para o acesso de *S. spontaneum*, Krakatau, a variação encontrada foi de $2n= 90-129$, e o número observado com maior frequência $2n= 128$ cromossomos.

Referências Bibliográficas

BONASORA, M. G.; POGGIO, L.; GREIZERSTEIN, E. J. Cytogenetic studies in four cultivated *Amaranthus* (Amaranthaceae) species. **Comparative cytogenetics**, v. 7, n. 1, p. 53, 2013.

CARDOSO, D. C.; CRISTIANO, M. P.; BARROS, L. A. C.; LOPES, D. M.; DAS GRAÇAS POMPOLO, S. First cytogenetic characterization of a species of the arboreal ant genus *Azteca* Forel, 1978 (Dolichoderinae, Formicidae). **Comparative cytogenetics**, v. 6, n. 2, p. 107, 2012.

CUADRADO, A.; ACEVEDO, R.; DE LA ESPINA, S. M. D.; JOUVE, N.; DE LA TORRE, C. Genome remodelling in three modern *S. officinarum* × *S. spontaneum* sugarcane cultivars. **Journal of experimental botany**, v. 55, n. 398, p. 847-854, 2004.

CUCO, S. M.; MONDIN, M.; VIEIRA, M. L. C.; AGUIAR-PERECIN, M. L. Técnicas para a obtenção de preparações citológicas com alta frequência de metáfases mitóticas em plantas: *Passiflora* (Passifloraceae) e *Crotalaria* (Leguminosae). **Acta Botanica Brasilica**, v. 17, n. 3, p. 363-370, 2003.

D'HONT, A.; RAO, P.; FELDMANN, P.; GRIVET, L.; ISLAM-FARIDI, N.; TAYLOR, P.; GLASZMANN, J. Identification and characterisation of sugarcane intergeneric hybrids,

Saccharum officinarum x *Erianthus arundinaceus*, with molecular markers and DNA in situ hybridisation. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 91, n. 2, p. 320-326, 1995.

D'HONT, A.; GRIVET, L.; FELDMANN, P.; GLASZMANN, J.; RAO, S.; BERDING, N. Characterisation of the double genome structure of modern sugarcane cultivars (*Saccharum* spp.) by molecular cytogenetics. **Molecular and General Genetics MGG**, v. 250, n. 4, p. 405-413, 1996.

D'HONT, A.; ISON, D.; ALIX, K.; ROUX, C.; GLASZMANN, J. C. Determination of basic chromosome numbers in the genus *Saccharum* by physical mapping of ribosomal RNA genes. **Genome**, v. 41, n. 2, p. 221-225, 1998.

D'HONT, A.; PAULET, F.; GLASZMANN, J. C. Oligoclonal interspecific origin of 'North Indian' and 'Chinese' sugarcanes. **Chromosome Research**, v. 10, n. 3, p. 253-262, 2002.

D'HONT, A. Unraveling the genome structure of polyploids using FISH and GISH; examples of sugarcane and banana. **Cytogenetic and genome research**, v. 109, n. 1-3, p. 27-33, 2005.

ELGSTI, O.; DUSTIN, P. Colchicine-in agriculture, medicine, biology and chemistry. **Colchicine-in agriculture, medicine, biology and chemistry.**, v. 50, 1955.

GRIVET, L.; ARRUDA, P. Sugarcane genomics: depicting the complex genome of an important tropical crop. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 5, n. 2, p. 122-127, 2002.

GUERRA, M.; SOUZA, M. D. Como observar cromossomos: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana. **Ribeirão Preto: FUNPEC**, 131p., 2002.

GUPTA, V.; KUMAR, A.; SAINI, I.; SAXENA, A. K. Cytogenetic profile of aplastic anaemia in Indian children. **The Indian journal of medical research**, v. 137, n. 3, p. 502, 2013.

IRVINE, J. *Saccharum* species as horticultural classes. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 98, n. 2, p. 186-194, 1999.

MONDIN, M.; NETO, A. D. Citogenética vegetal enfatizando a família Orchidaceae. **Orchidstudium**, v. 4, p. 24-54, 2006.

MOREJOHN, L. C.; FOSKET, D. E. The biochemistry of compounds with anti-microtubule activity in plant cells. **Pharmacology & therapeutics**, v. 51, n. 2, p. 217-230, 1991.

PERECIN, D.; BARBOSA, J.C. Afinidade entre distribuições de contágio e Poisson para fins práticos de amostragem. *Revista de Matemática e Estatística*, v.12, p.107-112, 1994.

PIPERIDIS, N.; CHEN, J.; DENG, H.; WANG, L.; JACKSON, P.; PIPERIDIS G. GISH characterization of *Erianthus arundinaceus* chromosomes in three generations of sugarcane intergeneric hybrids. **Genome**, Canadá, v.53, p.331-336, 2010.

SAS INSTITUTE. **SAS/STAT 9.2 user's guide**. SAS Institute, Cary, NC, USA, 2008.

SILVAROLLA, M.B.; AGUIAR-PERECIN, M. L. R. Evaluation of chromosome number stability in two sugarcane varieties. **Revista Brasileira de Genética**, v.17, p.237-242, 1994.

TLASKAL, J., HUTCHINSON, P. BThe detection of mitotic instability in sugarcane. **Sugarcane Breeders' Newsletter**, v. 31, p. 11-16, 1973.

CAPÍTULO 5 – Caracterização citogenética de acessos do Complexo *Saccharum*

RESUMO: A cana-de-açúcar é uma espécie pertencente ao gênero *Saccharum*. Apesar do grande papel dessa cultura na sociedade moderna pouco se sabe sobre o número cromossômico de acessos desse gênero. O presente trabalho teve como objetivo caracterizar, por meio da citogenética, diferentes acessos de *S. spontaneum* e uma cultivar moderna de cana-de-açúcar. Para isso, utilizou-se como antimitótico a 8-hidroxiquinolina a 0,04% por 4 horas. Os materiais foram fixados e seguidamente foram preparados lâminas mitóticas dos acessos CTC-6, uma cultivar comercial e IN84-58, IN84-88 e SES205A, acessos de *S. spontaneum*. A análise citogenética permitiu o estabelecimento da variação cromossômica no cultivar CTC-6 ($2n=92-126$) sendo a moda matemática, $2n=112$ cromossômico. Para o acesso de *S. spontaneum*, IN84-58, a variação cromossômica foi de $2n=70-102$ cromossomos, sendo a moda matemática, $2n=96$, para IN84-88 observou-se a variação de $2n=87-115$ cromossomos, sendo a moda matemática, $2n=104$ e para SES 205A a variação observada foi de $2n=62-64$ cromossomos, com moda matemática de $2n=64$. As informações aqui produzidas permitiram a classificação dos diferentes acessos por meio da análise cromossômica. Os dados gerados pelas contagens cromossômicas poderão influenciar na escolha de genitores para novos cruzamentos em cana-de-açúcar bem como permitirão a identificação mais precisa de determinados acessos de Complexo *Saccharum*.

Palavras-chave: cromossomos, CTC-6, IN84-58, IN84-88, *S. spontaneum*, SES205A

Introdução

A cana-de-açúcar está entre as culturas que despertam interesse no âmbito mundial atualmente. Apesar desse grande interesse científico, estudos relacionados a contagem dos números cromossômicos de cultivares atuais de cana-de-açúcar, são poucos e relativamente antigos. A cana-de-açúcar tem elevada ploidia, um genoma extremamente complexo, além de aneuploidias e instabilidade cromossômica (GRIVET; ARRUDA, 2002). Esses fatores aliados a dificuldade na obtenção de uma

técnica concisa que facilite a contagem correta do real número cromossômico da espécie tem colaborado para a falta de estudos citogenéticos da mesma.

Dentre as espécies do gênero *Saccharum*, ao qual pertence a cana-de-açúcar, as contagens cromossômicas são limitadas, sendo poucas as informações referentes a acessos selvagens e cultivares comerciais.

A espécie *S. spontaneum* tem amplas variações nos números cromossômicos, apresentando o maior número de citótipos (PIPERIDIS et al., 2010). O número cromossômico varia de $2n=40-128$, sendo encontrados diferentes citótipos para a espécie (CUADRARO et al., 2004; D'HONT et al. 1998, PANJE; BABU, 1960). De acordo com D'Hont (2005), *S. spontaneum* tem número básico igual a 8 cromossomos. Nos cultivares atuais de cana-de-açúcar, essa espécie contribui com 10 a 20% dos cromossomos (D'HONT et al., 1998).

Entre as espécies usadas amplamente no melhoramento genético, *Saccharum officinarum*, ao contrário das demais do gênero, não possui variação em seu número cromossômico ($2n= 80$ cromossomos) (PRICE, 1963). Essa espécie é a que mais contribuiu geneticamente nos cultivares de cana-de-açúcar atuais. Nos cultivares modernos cerca de 70 a 80% dos cromossomos são derivados dessa espécie (D'HONT et al, 1998).

Nos dias de hoje, acredita-se que as cultivares modernas de cana-de-açúcar são originárias de cruzamentos interespecíficos, principalmente de *S. officinarum* e *S. spontaneum*. Estes híbridos apresentam número cromossômico variando de $2n=100-130$ cromossomos (D'HONT et al., 1996; PIPERIDS et al., 2000).

Segundo Oliveira (2006), a maioria dos estudos citogenéticos realizados até o momento em cana-de-açúcar, são especulativos em termos de informações de estrutura e organização do genoma. Além dos desafios atrelados a dificuldades inerentes ao genótipo da cana, problemas relacionados à técnica e falta de padronização no processo de obtenção de metáfases em diferentes acessos do gênero *Saccharum*, dificultam ou atrasam a obtenção de informações cromossômicas nos mais diferentes acessos dessa espécie.

O presente trabalho teve como objetivo a contagem do número cromossômico de acessos do gênero *Saccharum*, com ênfase em citótipos de *S. spontaneum*.

Material e métodos

Para dar início aos estudos citogenéticos dos acessos do Complexo *Saccharum* gemas retiradas de diferentes colmos dos genótipos, CTC-6, IN84-58, IN84-88 e SES205A, foram coletadas no campo de experimentação do Instituto Agronômico de Campinas – Centro de Cana. Os materiais acima citados são de interesse para futuros cruzamentos visando o aumento de biomassa e fibra. Esses foram colocados para brotar em bandejas plásticas contendo *Sphagnum* ou Plantmax® umedecidos com água. As bandejas então permaneceram em câmara de germinação (B.O.D.), com temperatura constante de 35°C (+1-1) até a obtenção de raízes com cerca de 3 centímetros. Esses foram coletadas e imediatamente imersas em antimetabólico (8-hidroxiquinolina na concentração de 0,04%), por 4 horas, à temperatura ambiente.

Posteriormente, essas raízes foram lavadas e fixadas em solução Carnoy (3 etanol: 1 ácido acético glacial) e acondicionadas em geladeira. As preparações citogenéticas foram realizadas de acordo com Guerra e Souza (2002).

As metáfases e pró-metáfases obtidas no experimento foram classificadas como: boas quando apresentavam um alto grau de espalhamento cromossômico e boa condensação cromossômica; médias quando apresentavam boa condensação, porém com cromossomos sobrepostos; e ruins quando apresentavam baixo grau de espalhamento cromossômico e baixa condensação cromossômica. Para cada tipo de metáfase, foi atribuída uma nota, sendo nota 3 as metáfases com boa qualidade, nota 2 as metáfases com qualidade média e nota 1 as metáfases com qualidade ruim. A nota das metáfases foi ponderada pelo número cromossômico encontrado, como proposto por Ferrari (2010). Desta forma, uma metáfase com nota 3 foi contabilizada 3 vezes (ou seja, como 3 contagens desse determinado número cromossômico), enquanto uma metáfase nota 2, foi contabilizada como 2 contagens desse número cromossômico.

Para cada acesso optou-se por analisar um número diferente de contagens, para o genótipo CTC-6, 33 metáfases, para IN84-58, 34 metáfases, IN84-88, 37 metáfases e SES205A, 11 metáfases uma vez que essa espécie apresentou a menor variação cromossômica e o menor número de cromossomos, fato que facilitou a contagem correta dos mesmos. O uso de diferentes números de contagens se deu devido à dificuldade de obtenção de metáfases bem espalhadas nos diversos

materiais. Baseado nas contagens e na ponderação de acordo com a qualidade das metáfases foram construídos gráficos por meio do programa Excel.

As metáfases foram observadas em microscópio óptico no aumento de 1000x e a contagem cromossômica auxiliada pelo programa IKAROS (Metasystems). As imagens das metáfases foram obtidas por meio da câmera AxioCam ERc 5s (Carl Zeiss) e do programa AxioVision 4.8 (Carl Zeiss Vision).

Resultados e Discussão

A variação cromossômica encontrada no cultivar CTC-6 foi de $2n=92$ a $2n=126$, sendo a moda $2n=112$ (35,1% das metáfases) (Figura 1, Figura 2). Para os acessos de *S. spontaneum* IN84-58 a variação cromossômica foi de $2n=70$ a $2n=102$ cromossomos, sendo a moda $2n=96$ (58% das metáfases) (Figura 1, Figura 3); para IN84-88 observou-se a variação de $2n=87$ a $2n=115$ cromossomos, sendo a moda $2n=104$ (45,7% das metáfases) (Figura 1, Figura 4), para SES 205A a variação foi de $2n=62$ a $2n=64$ cromossomos, com moda de $2n=64$ (75% das metáfases) (Figura 1, Figura 5).

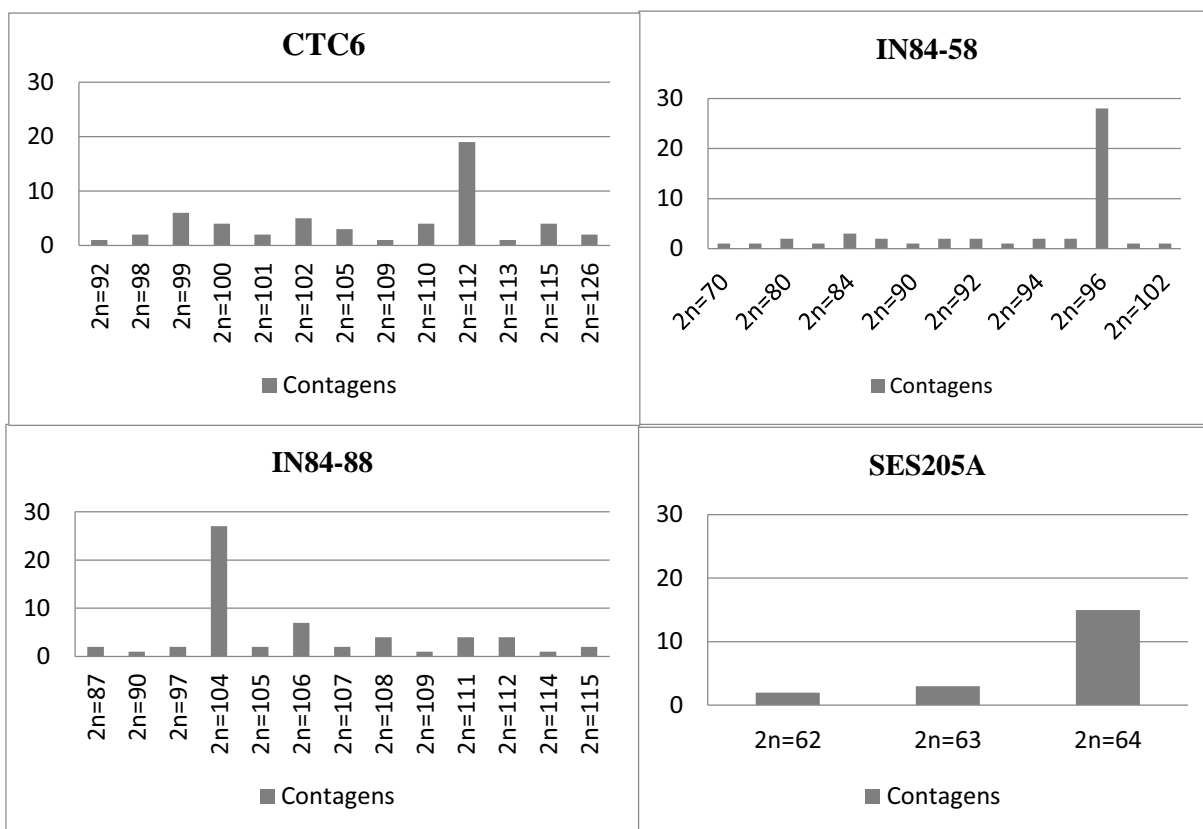


Figura 1 - Variação cromossômica dos genótipos CTC-6, IN84-58, IN84-88 e SES205A.

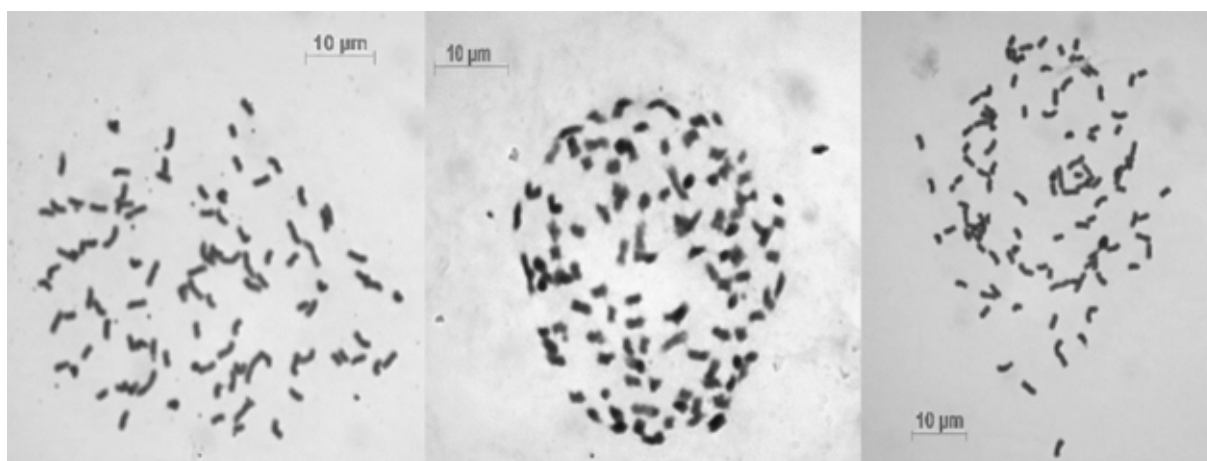


Figura 2- Metáfases mitóticas do cultivar CTC-6 com $2n=112$ cromossomos

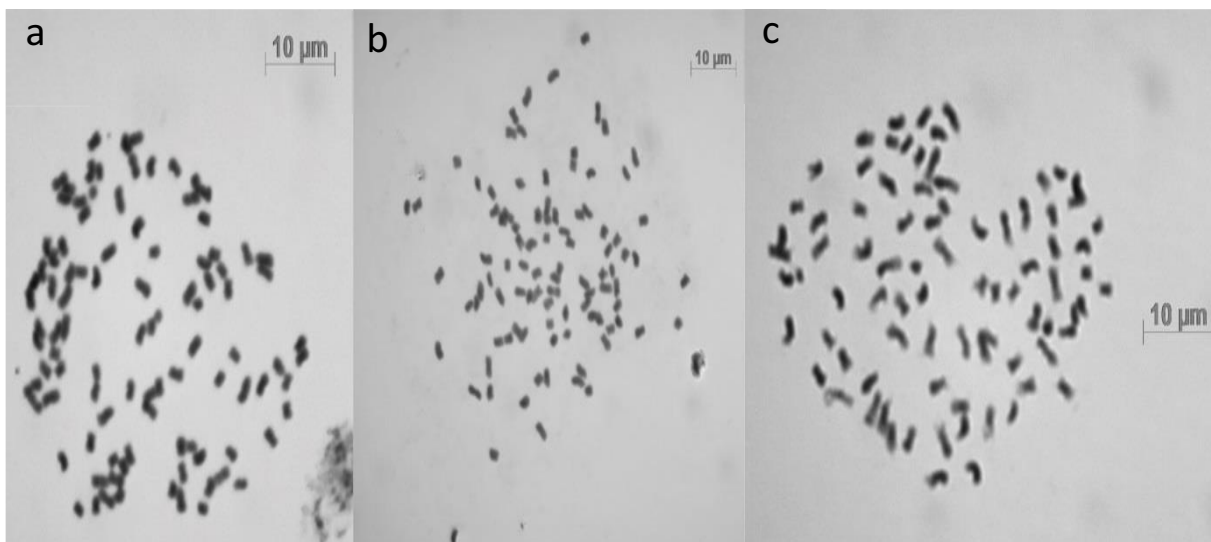


Figura 3- Metáfases mitóticas de IN84-58: a) $2n=96$ cromossomos b) $2n=96$ cromossomos c) $2n=84$ cromossomos.

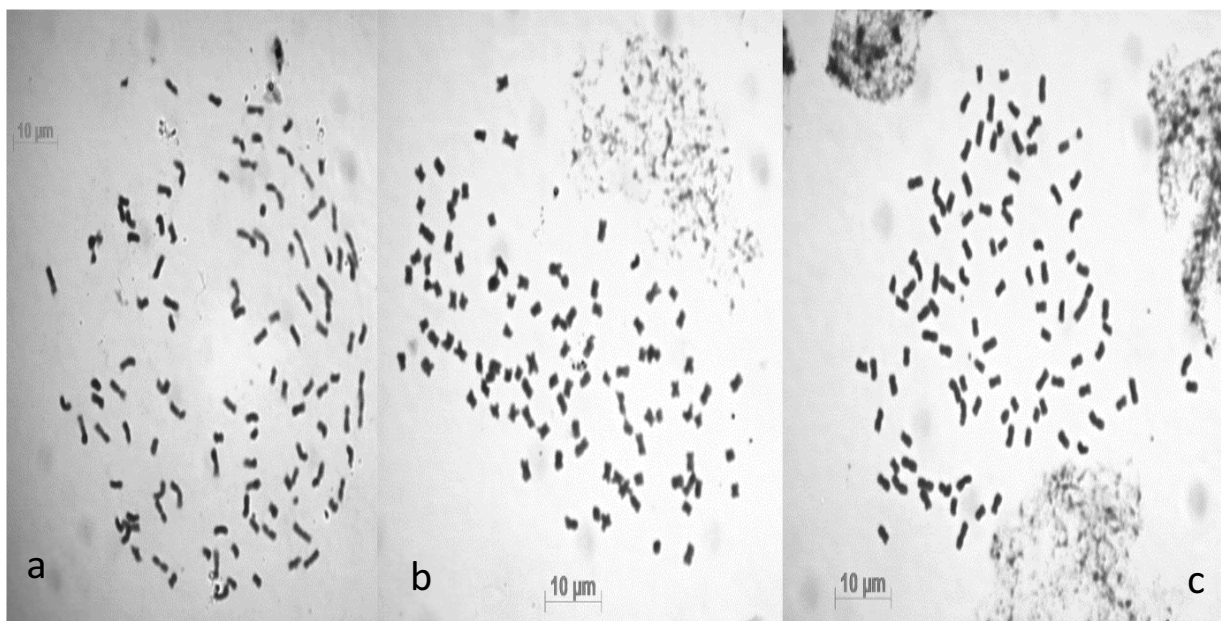


Figura 4- Metáfases mitóticas de IN84-88: a) $2n= 108$ cromossomos b) $2n= 104$ cromossomos c) $2n=104$ cromossomos.

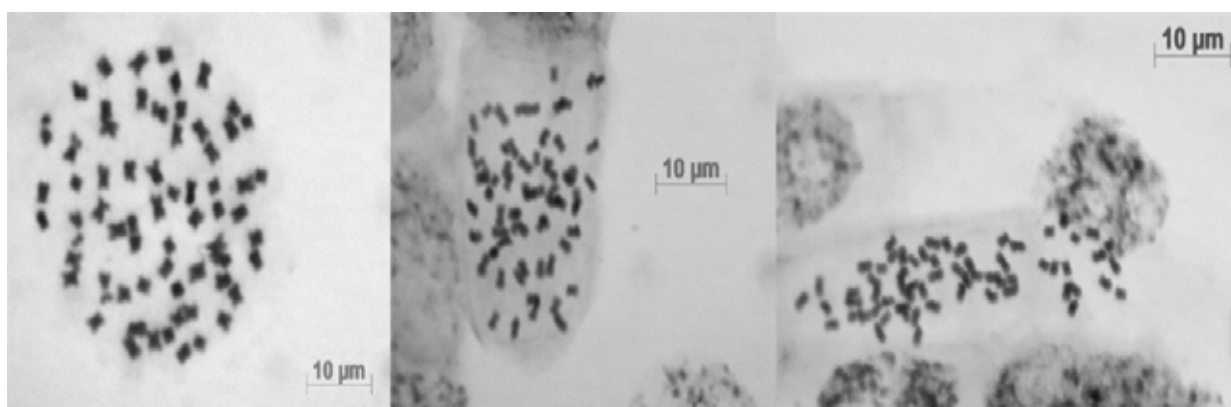


Figura 5 - Metáfases mitóticas de SES205A com $2n= 64$ cromossomos.

A alta variação no número de cromossomos de cana pode ser explicada pela grande dificuldade em se obter células intactas onde não ocorram perdas de cromossomos na maceração da raiz, ou ainda pela interpretação errada de cromossomos sobrepostos (TLASKAL; HUTCHINSON 1973), no entanto, a existência de aneuploidismos não podem ser descartadas uma vez que isto é comum para a espécie. A grande quantidade aliada ao tamanho pequeno e a similaridade dos cromossomos de cana também são fatores que influenciam na análise cromossômica do gênero *Saccharum* (D'HONT, 2005).

O valor encontrado para as cultivares atuais de cana-de-açúcar neste trabalho é corroborado por D'Hont et al. (1996) que afirma que os genótipos modernos de cana-de-açúcar têm número cromossômico variando de $2n= 100-130$ cromossomos. Silvarolla e Aguiar-Perecin (1994) identificaram como número cromossômico da cultivar NA56-79, $2n=114$ e para a cultivar Co419, $2n=113$ cromossomos, Jenkin et al. (1995) obtiveram como números cromossômicos $2n = 112$ e $2n = 110$ para cultivares MQ66-14 e 85N904 respectivamente, Barreto e Simon (1982) encontraram para a cultivar POJ 2878 a variação cromossômica de $2n = 117-124$, para POJ 2725 a variação foi de $2n = 92-108$ e para a cultivar Co281 $2n = 115$; para a cultivar R570, D'Hont et al. (1996) sugeriram a variação cromossômica de $2n= 107-115$; para o cultivar NCo376, D'Hont (2005), encontrou número cromossômico próximo de $2n=112$ cromossomos. Cuadrado et al. (2004) analisaram três acessos de cultivares modernas de cana-de-açúcar originados do cruzamento de *S. officinarum* e *S. spontaneum* e

encontraram, para o cultivar My5514, o número aproximado de $2n=103$, para B42231, o valor próximo foi de $2n=110$ e para C236-51, $2n\sim 115$ cromossomos.

Para a espécie *S. spontaneum* tem-se observado na literatura uma ampla variação do número cromossômico sendo essa de $2n = 40$ à $2n = 128$ com elevado número de citótipos com $2n = 64$, $2n = 80$, $2n = 96$, $2n = 112$, $2n = 128$ (PANJE; BABU, 1960) números esses concordantes com o resultado encontrado por D`Hont et al., (1998) que confirmam o número cromossômico básico da espécie como sendo $n=8$ cromossomos. Neste trabalho, é possível se observar citótipos com $2n= 64$ (SES205A), $2n=96$ (IN84-58) e $2n= 104$ (IN84-88). Irvine (1999) constatou em seus trabalhos uma grande quantidade de acessos de *S. spontaneum* com número $2n=64$, sendo também frequente a contagem $2n=80$ cromossomos, esse último número cromossômico não foi encontrado neste trabalho. D`Hont et al. (1998) relataram diferentes números cromossômicos em clones de *S. spontaneum* sendo para SES 14, $2n = 64$, SES 106B, $2n = 64$, Mol 5801, $2n = 80$, NG 51-2, $2n = 80$, Mandalay, $2n = 96$, e Glagah 1286, $2n = 112$ cromossomos. Citótipos como o Coimbatore com $2n=64$ e Java, com $2n=112$ estão presentes na base genealógica de todas as cultivares modernas de cana-de-açúcar (PEIXOTO, 1988, citado por FERRARI, 2010).

Conclusões

A contagem do número cromossômico foi eficiente para caracterizar os acessos IN84-58, IN84-88, SES 205A e CTC-6. As informações geradas pelos dados cromossômicos poderão influenciar na escolha de genitores para novos cruzamentos em cana-de-açúcar bem como permitirão a identificação de determinados acessos de Complexo *Saccharum*.

Referências Bibliográficas

BARRETO, A.; SIMÓN, J. Identificación de progenies y progenitores por el análisis del número cromosómico en *Saccharum*. **Turrialba (IICA)**.(Abr-Jun, v. 32, n. 2, p. 169-180, 1982.

CUADRADO, A.; ACEVEDO, R.; DE LA ESPINA, S. M. D.; JOUVE, N.; DE LA TORRE, C. Genome remodelling in three modern *S. officinarum* × *S. spontaneum* sugarcane cultivars. **Journal of experimental botany**, v. 55, n. 398, p. 847-854, 2004.

D'HONT, A.; GRIVET, L.; FELDMANN, P.; GLASZMANN, J.; RAO, S.; BERDING, N. Characterisation of the double genome structure of modern sugarcane cultivars (*Saccharum* spp.) by molecular cytogenetics. **Molecular and General Genetics MGG**, v. 250, n. 4, p. 405-413, 1996.

D'HONT, A.; ISON, D.; ALIX, K.; ROUX, C.; GLASZMANN, J. C. Determination of basic chromosome numbers in the genus *Saccharum* by physical mapping of ribosomal RNA genes. **Genome**, v. 41, n. 2, p. 221-225, 1998.

D'HONT, A. Unraveling the genome structure of polyploids using FISH and GISH; examples of sugarcane and banana. **Cytogenetic and genome research**, v. 109, n. 1-3, p. 27-33, 2005.

FERRARI, F. **Caracterização cromossômica em cana-de-açúcar (*Saccharum* spp., Poacea)**, 2010, 91 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.

GRIVET, L.; ARRUDA, P. Sugarcane genomics: depicting the complex genome of an important tropical crop. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 5, n. 2, p. 122-127, 2002.

GUERRA, M.; SOUZA, M. D. Como observar cromossomos: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana. **Ribeirão Preto: FUNPEC**, 131p., 2002.

IRVINE, J. *Saccharum* species as horticultural classes. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 98, n. 2, p. 186-194, 1999.

JENKIN, M.; READER, S.; PURDIE, K.; MILLER, T. Detection of rDNA sites in sugarcane by FISH. **Chromosome Research**, v. 3, n. 7, p. 444-445, 1995.

OLIVEIRA, K. M. **Desenvolvimento de marcadores moleculares EST-RSSs e mapeamento funcional em cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.)**. 2006. 165 f. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular – Genética Vegetal e Melhoramento). Universidade Estadual de Campinas- Instituto de Biologia. Campinas, 2006.

PANJE, R.; BABU, C. Studies in *Saccharum spontaneum* distribution and geographical association of chromosome numbers. **Cytologia**, v. 25, p. 152-72, 1960.

PEIXOTO, T.C. Genealogia e grau de parentesco de progenitores e progênes. Boletim Técnico Copersucar, v.40, p.32-38, 1988.

PIPERIDIS, N.; CHEN, J.; DENG, H.; WANG, L.; JACKSON, P.; PIPERIDIS G. GISH characterization of *Erianthus arundinaceus* chromosomes in three generations of sugarcane intergeneric hybrids. **Genome**, Canadá, v.53, p.331-336, 2010.

PIPERIDIS, G.; CHRISTOPHER, M. J.; CARROLL, B. J.; BERDING, N.; D'HONT, A. Molecular contribution to selection of intergeneric hybrids between sugarcane and the wild species *Erianthus arundinaceus*. **Genome**, v. 43, n. 6, p. 1033-1037, 2000.

PRICE, S. Cytogenetics of modern sugar canes. **Economic Botany**, v. 17, n. 2, p. 97-106, 1963.

SILVAROLLA, M.B.; AGUIAR-PERECIN, M. L. R. Evaluation of chromosome number stability in two sugarcane varieties. **Revista Brasileira de Genética**, v.17, p.237-242, 1994.

TLASKAL, J., HUTCHINSON, P. B. The detection of mitotic instability in sugarcane. **Sugarcane Breeders' Newsletter**, v. 31, p. 11-16, 1973.

CAPÍTULO 6 – Caracterização molecular e citogenética de híbridos interespecíficos (*S. officinarum* x *S. spontaneum* x *Saccharum spontaneum*) para a introgressão

RESUMO: As cultivares modernas de cana, *S. officinarum* x *S. spontaneum*, são híbridos vigorosos, originários principalmente de hibridações interespecíficas entre *S. officinarum* e *S. Spontaneum*, seguidos por vários retrocruzamentos com *S. officinarum* para recuperar teor de sacarose perdendo, no entanto, características atualmente importantes como alta biomassa e produção de fibras. Programas de introgressão interessados nessas características têm utilizado cruzamentos entre cultivares comerciais de cana e acessos de *S. spontaneum* para promover o aumento biomassa e fibra. Baseado nisso, o presente trabalho teve como objetivo identificar híbridos oriundos desses cruzamentos por meio de marcadores moleculares do tipo microssatélite e compreender melhor os processos de transmissão gamética e participação genotípica de *S. spontaneum* em um grupo de híbridos previamente identificados. Para isso, diferentes pares de primers de microssatélites foram utilizados para a confirmação da natureza híbrida de materiais selecionados no campo. Após a confirmação da hibridação, materiais selecionados foram estudados por meio da técnica de citogenética molecular, GISH e FISH. Os marcadores moleculares foram eficientes na comprovação da natureza híbrida e na identificação de pólen exógeno nos cruzamentos. O número de cromossomos dos híbridos analisados variou de $2n = 100-118$, confirmando a natureza haplóide dos gametas e transmissão $n + n$, dos mesmos. Nos híbridos analisados, cerca de 60% dos cromossomos pertenciam a *S. spontaneum* e 40% a *S. officinarum*. Ambas as técnicas permitiram a confirmação da natureza híbrida dos genótipos oriundos do cruzamento entre cultivares comerciais e acessos de *S. spontaneum*, bem como forneceram informações sobre a transmissão gamética, participação dos genótipos no genoma e presença de pólen exógeno no cruzamento.

Palavras-chave: GISH, microssatélites, biomassa, cana-de-açúcar, hibridação.

Introdução

Os programas de melhoramento genético de cana-de-açúcar têm enfatizado o desenvolvimento de cultivares que busquem ampliar a produtividade energética do país (LANDELL; BRESSIANI, 2008). Nesse contexto, a indústria sucroalcooleira é uma das poucas a produzir e vender, competitivamente, energia elétrica excedente oriunda do bagaço da cana, sendo essa energia de extrema importância principalmente no período de seca. O Brasil possui, potencialmente na forma de canavial, energia equivalente a três Belo Monte (complexo com potencial hídrico na Bacia do Rio Xingu) (JANK, 2014). Além disso, este tipo de energia, quando comparado às usinas hidrelétricas, colabora para a redução dos problemas ambientais e socioeconômicos além de permitir a criação de créditos de carbono e a produção de energia em período seco do ano (COOK et al., 1991, SILVA; SILVA, 2013, UNICA, 2011).

Nesse sentido, os programas de melhoramento têm investido em trabalhos de introgressão para agregar altos valores de biomassa e fibras em novas cultivares de cana, sendo esses genótipos identificados como cana-energia.

Apesar da tentativa nos últimos 20 anos de se aumentar a base genética da cana, os cultivares de cana-de-açúcar plantados no mundo ainda são híbridos de sexta a décima geração, com predominância maior de *S. officinarum* e participação menor de *S. spontaneum*. Porém, estudos com cruzamentos interespecíficos entre os diferentes gêneros do Complexo *Saccharum* têm merecido destaque como forma de introgressão de genes para aumento de fibras e biomassa. Segundo D'Hont et al. (1995) a hibridação interespecífica proporciona um grande avanço no melhoramento da cana, uma vez que permite benefícios como resistência a doenças, aumento na produtividade, adaptabilidade para o crescimento em diferentes condições de estresse, entre outros.

Recentemente, o Programa de Melhoramento de Cana de Açúcar do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) iniciou um Programa de Introgressão Genética para desenvolver materiais com alto teor de biomassa. Este programa tem como estratégia o cruzamento entre cultivares comerciais e acessos de *S. spontaneum* sendo essa

última, rica em fibra, biomassa e resistência a doenças servindo como fonte de genes para cana-energia

Para melhor compreensão dos intercruzamentos, bem como para a comprovação da efetividade dos mesmos, vários estudos têm sido realizados (AITKEN et al., 2007, PIPERIDIS et al., 2000,). Trabalhos relacionados à caracterização híbrida têm sido conduzidos por meio do uso de marcadores moleculares e da técnica de hibridização *in situ* em híbridos de cana-de-açúcar. Marcadores do tipo microssatélites têm sido utilizados com sucesso para teste de paternidade ou exclusão em cana-de-açúcar, sendo importantes também na estimativa da taxa de cruzamento, ou autofecundação em famílias derivadas de cruzamentos bi-parentais ou de policruzamentos, bem como na identificação dos genitores nesses últimos (CAI et al., 2004, MCINTYRE; JACKSON, 2001; MELLONI et al., 2014; XAVIER et al., 2014). Na área da citogenética molecular, os trabalhos com híbridos têm procurado compreender a participação dos genomas genitores no genoma dos híbridos e a efetividade dos cruzamentos, sejam eles naturais ou artificiais (BAILEY et al.,1993), CUADRADO et al., 2004, D'HONT, 2005, D'HONT et al.,1995, D'HONT et al.,1996).

Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo principal identificar híbridos oriundos de cruzamentos entre cultivares comerciais e *S. spontaneum* por meio de marcadores moleculares do tipo microssatélites e compreender os processos de transmissão gamética e participação genotípica de *S. spontaneum* em um grupo de híbridos, por meio de citogenética molecular (GISH e FISH).

Material e métodos

Análise molecular

Indivíduos oriundos do cruzamento de RB855465 (*S. officinarum* x *S. spontaneum*) x GlagaH (*S. spontaneum*) e IAC91-1099 (*S. officinarum* x *S. spontaneum*) x Krakatau (*S. spontaneum*) tiveram seus DNAs extraídos para a validação da natureza híbrida. Do cruzamento RB855465 (*S. officinarum* x *S. spontaneum*) x GlagaH (*S. spontaneum*), foram avaliados oito híbridos com alta performance identificados como Clone221, Clone 231, Clone 244, Clone 283, Clone

292, Clone 297, Clone 303 e Clone 316. Do cruzamento entre IAC91-1099 (*S. officinarum* x *S. spontaneum*) x Krakatau (*S. spontaneum*), seis híbridos foram avaliados e identificados como IACBIO1240, IACBIO1241, IACBIO1262, IACBIO1263, IACBIO1264, IACBIO1265. Para a confirmação da natureza híbrida foram utilizados quatro pares de primers (SCB312, SCB 381, SCB 436 e SCB 213) para o cruzamento entre IAC91-1099 x Krakatau e 5 pares de primers (SCB381, SCB312, SCB436, SCB423 e SCA48) para RB855465 x GlagaH. As reações de PCR foram realizadas de acordo com o protocolo estabelecido por Pinto et al. (2004). Os produtos de PCR foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante a 5% no genotipador de DNA da Licor 4300. Os marcadores produzidos nos géis poliacrilamida foram genotipados com base na presença (1) e ausência (0). A estimativa da dissimilaridade genética ($D = 1-S$) foi calculada por meio do complemento da similaridade genética (S) obtida pelo coeficiente de Jaccard (1901). As relações de dissimilaridade genética foram visualizadas pela construção de um dendrograma baseado no método de Neighbor Joining utilizando o programa Darwin 5 (PERRIER; JACQUEMOUD-COLLET, 2006). Para constatar a consistência da topologia formada optou-se pela utilização do método de bootstrap com 1000 repetições.

Para a confirmação da natureza híbrida foi realizado um teste de paternidade considerando as marcas presentes nas progênes e nos respectivos genitores feminino e masculino (MELLONI et al., 2014).

Citogenética Molecular

Para a aplicação das técnicas de FISH (Hibridização fluorescente *in situ*) utilizou-se os clones 221, 292 e 303 do cruzamento entre RB855465 e GlagaH. Experimentos de hibridização genômica *in situ* (GISH) foram realizados nos clones 292 e 221 devido ao maior número de metáfases de boa qualidade. Para a confecção das lâminas utilizadas na hibridização *in situ* utilizou-se o processo de secagem ao ar. As raízes foram lavadas duas vezes por cerca de 10 minutos em tampão de citrato (ácido cítrico 4mM +citrato trisódico 6mM).

O material foi transferido para uma solução enzimática (2% celulase e 3% pectinase de *Aspergillus niger*) e colocado em estufa a 37 °C por cerca de 1 hora. Em

seguida foi colocada uma amostra de raízes em uma pequena placa de petri contendo ácido acético 45% por 1-5 minutos. Utilizou-se pontas dessas raízes que foram removidas com o auxílio de um estéreo microscópio, e dissecadas com a adição de uma gota de ácido acético 60%. O material foi espalhado cuidadosamente com o auxílio de uma agulha e aplicou-se seguidamente uma lamínula.

O conjunto lâmina-lamínula passou por uma leve pressão utilizando a ponta dos dedos e papel filtro. A lâmina foi observada em um microscópio de contraste de fase. Quando com boa qualidade foi colocada sobre gelo seco por cerca de 10 minutos. Passado este período, a lamínula foi removida com o auxílio de um estilete. As lâminas de boa qualidade foram armazenadas a -20 °C para posterior uso nos procedimentos de GISH e FISH.

Para a aplicação da técnica de GISH e FISH foram produzidas sondas pTa71 (5S) e pTa794 (45S) e sondas genômicas produzidas com DNA extraídos do acesso GlagaH (*S. spontaneum*) e Green German (*S. officinarum*). Para a confecção das sondas pTa71 (5S) e pTa794 (45S) utilizou-se DNA de trigo. Para confecção das diferentes sondas de DNA genômico, amostras de DNAs extraídos foram partidas (quebradas) por meio de alta temperatura (110°C por 4 minutos) em autoclave. Para a marcação desses materiais utilizou-se os procedimentos descritos no kit, Bioprime® Array CGH Genomic Labelling System seguido de purificação por meio do kit NucleoSpin® Extract II. Para a realização da hibridização *in situ* utilizou-se os protocolos estabelecidos por Schwarzacher e Heslop-Harrison (2000).

As soluções de hibridização utilizadas no experimento continham: 50% Formamida, 2 x SSC, 10% Dextran Sulfato, DNA de esperma de salmão, 0.125mM EDTA, 0.125% SDS e as diferentes sondas sendo utilizado 2µl de DNA genômico marcado na concentração de 2µg/ µl de *S. officinarum* (Green German) e *S. spontaneum* (GhagaH) ou pTa71 (5S) e pTa794 (45S) na concentração de 1 µg/ µl para cada reação. As lâminas selecionadas foram então, cobertas por essa solução de hibridização permaneceram em termociclador Hipro 200 (ThermoHybaid) sobre vibração a 72°C por 7 minutos seguido de 20 horas a 37°C. Em cada lâmina contendo material hibridado aplicou-se em uma solução de anticorpos contendo (1-6µg/ml conjugado de anti-digoxigenina (FITC conjugado-verde) e streptavidina (Alexa594-vermelho) dissolvidos em solução bloqueadora. As lâminas foram contra coradas com DAPI, 4,6-diamino-2-fenil indol (4µg/ml em tampão McIlvaine's buffer). As

preparações cromossômicas foram observadas em microscópio de epifluorescência Nikon e as imagens processadas com o auxílio do Adobe Photoshop, utilizando-se apenas as funções de contraste que afetam toda a imagem.

Resultados e discussão

Para o cruzamento RB855465 (*S. officinarum* x *S. spontaneum*) x GlagaH (*S. spontaneum*), os cinco pares de primers SSRs produziram um total de 56 marcas as quais foram observadas entre os genitores e progênie. Entre os 8 clones deste cruzamento, a maior dissimilaridade genética (0,54) foi observada entre o clone 316 e o clone 283 e a menor (0,27) entre os clones 231 e o clone 221. O clone 303 se mostrou menos dissimilar a cultivar RB855465 (0,37) enquanto o clone 292 mostrou-se menos similar a GlagaH (0,42) (Figura 1). O clone 221 mostrou-se o mesmo s dissimilar com o genitor GlagaH (0,53) e o clone 292 com a RB855465 (0,51). No cruzamento entre IAC91-1099 (*S. officinarum* x *S. spontaneum*) e Krakatau (*S. spontaneum*) foram obtidas 58 marcas. A maior dissimilaridade genética (0,65) entre os híbridos foi encontrada entre IACBIO1265 e IACBIO1241 e o menor (0,32) entre IACBIO1264 e IACBIO1262. O clone IACBIO1241 se mostrou menos dissimilar a cultivar IAC91-1099 (0,37), enquanto o clone IACBIO1265 mostrou-se menos dissimilar a Krakatau (0,43) (Figura 2).

Concomitantemente foi possível verificar a presença de um clone não oriundo do cruzamento em questão, o clone IACBIO1241 (Figura 3).

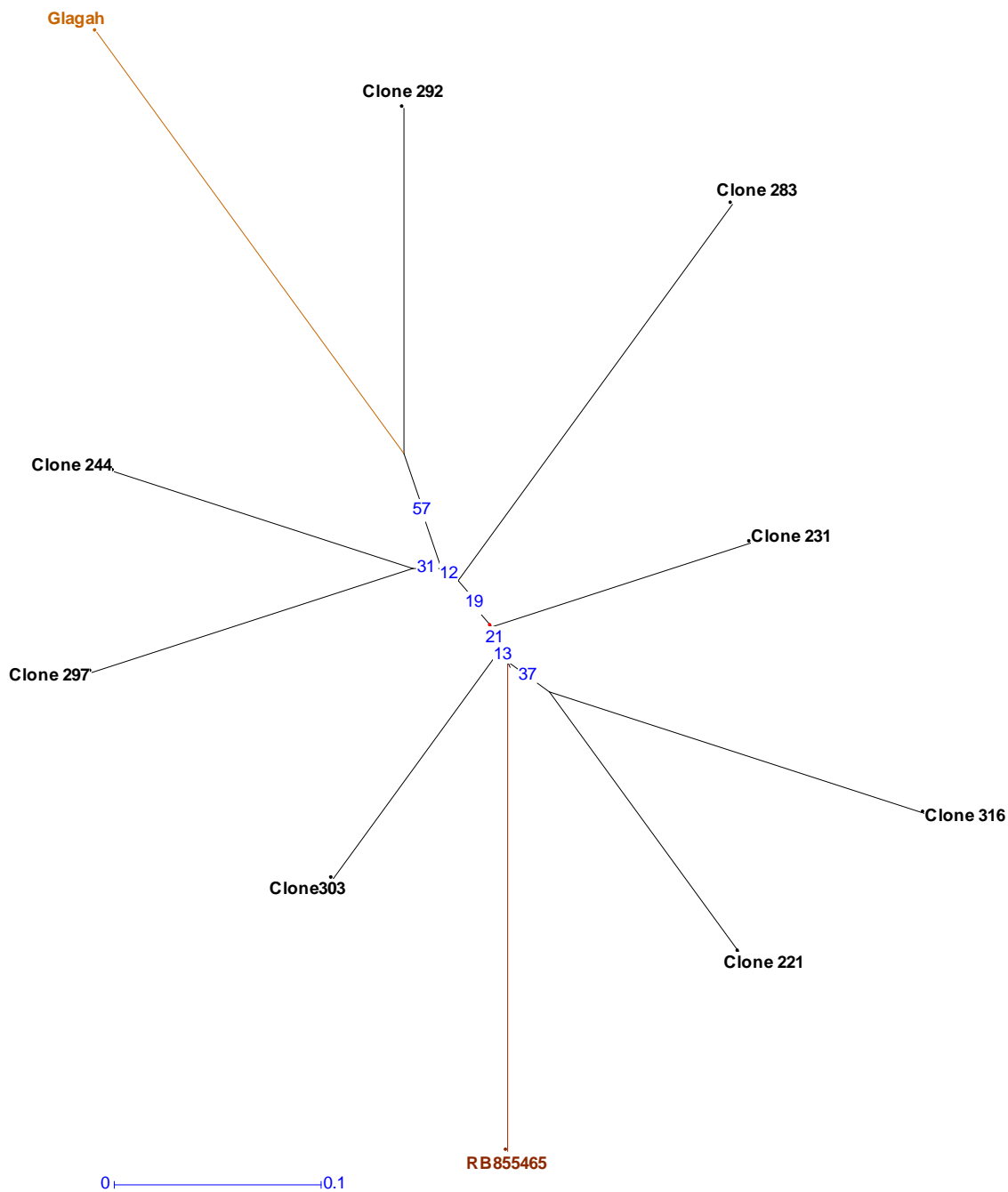


Figura 1– Dendrograma referente aos híbridos do cruzamento RB855465 (*S. officinarum* x *S. spontaneum*) x Glagah (*S. spontaneum*), obtido pelo agrupamento Neighbor Joining apresentando as relações de dissimilaridade genéticas entre os clones e genitores obtidas pelo complemento do coeficiente de similaridade de Jaccard. Os valores de bootstrap em porcentagem estão apresentados nos nós de cada agrupamento.

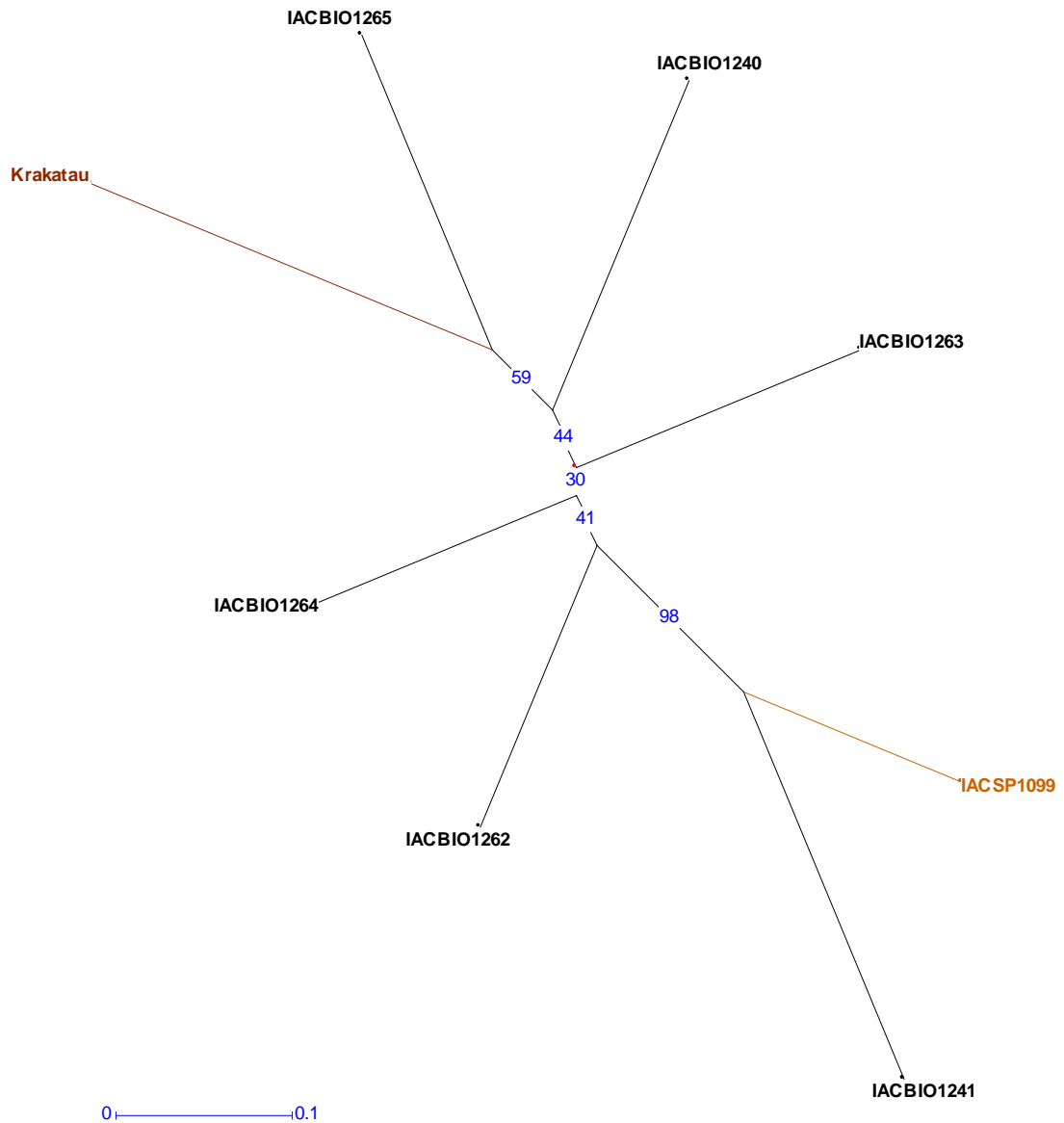


Figura 2 - Dendrograma referente aos híbridos do cruzamento IAC91-1099 (*S. officinarum* x *S. spontaneum*) x Krakatau (*S. spontaneum*) obtido pelo agrupamento Neighbor Joining apresentando as relações de dissimilaridade genéticas entre os clones e genitores obtidas pelo complemento do coeficiente de similaridade de Jaccard. Os valores de bootstrap em porcentagem estão apresentados nos nós de cada agrupamento.

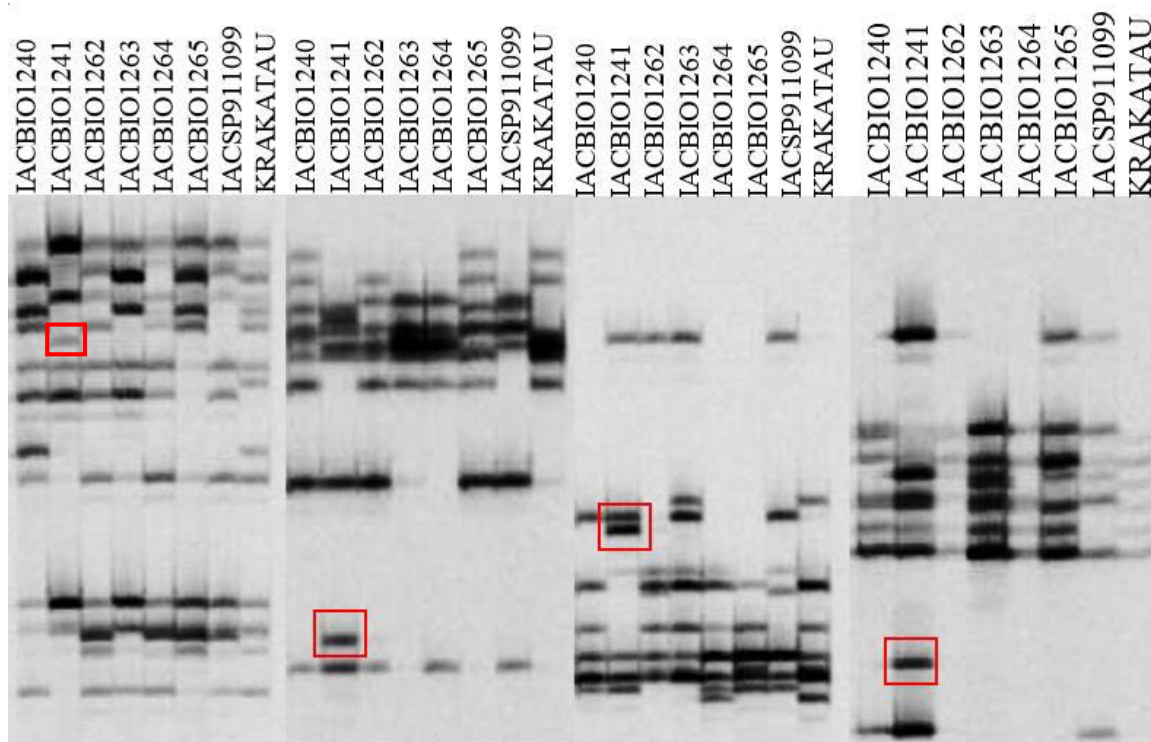


Figura 3. Perfil molecular dos clones do cruzamento IAC91-1099 (*S. officinarum* x *S. spontaneum*) e Krakatau (*S. spontaneum*). As marcas em vermelho são referentes a marcadores ausentes em pelo menos um dos genitores.

Os marcadores moleculares permitiram confirmar a ausência de autofecundação dos materiais selecionados bem como a presença de um indivíduo oriundo de pólen exógeno no cruzamento entre IAC91-1099 (*S. officinarum* x *S. spontaneum*) x Krakatau (*S. spontaneum*) (Figura 3). De fato, problemas relativos a autopolinização e fecundação por pólenes exógenos são comuns em cana-de-açúcar (CAI et al., 2005). Melloni et al. (2014) encontraram também materiais oriundos de pólenes diferentes dos utilizados em seus cruzamentos. Segundo Brown et al. (2007) uma das razões para classificação errada de híbridos de cana, sejam os mesmos clones comerciais ou materiais oriundos de novos cruzamentos, é a possibilidade de contaminação por pólen externo ao cruzamento trazido pelo vento, insetos ou ainda por plantas que podem realizar a auto-polinização, uma vez que nem sempre é possível a total esterilização ou separação dos pólenes utilizados nas estruturas de cruzamento. Para Zhang et al. (2009) a eficiência dos programas de melhoramento genético em cana pode ser aumentada com o uso de marcadores moleculares que comprovem a efetividade dos cruzamentos. A comprovação do caráter híbrido de

materiais oriundos de cruzamentos pode indicar também o quão precisa é a seleção feita no campo, podendo economizar tempo, custo e trabalho no processo de lançamento de novas cultivares (MANIGBAS;VILLEGAS 2004).

As análises dos híbridos por meio da citogenética molecular geraram informações que permitiram aumentar os conhecimentos sobre o comportamento dos genitores na formação dos materiais estudados. Os clones analisados tiveram diferentes variações no número cromossômico. O clone 221 teve variação de 102 a 116 cromossomos, sendo possível observar maior número de metáfases contendo 110 cromossomos (Figura 4). Para o clone 292 a variação obtida foi de 106 a 124 cromossomos (Figura 5), sendo possível a observação de um grande número de metáfases com 110 e 118 cromossomos. Para o clone 303 o número cromossômico variou de 106 a 118 (Figura 6), sendo o número mais observado $2n=114$ cromossomos.

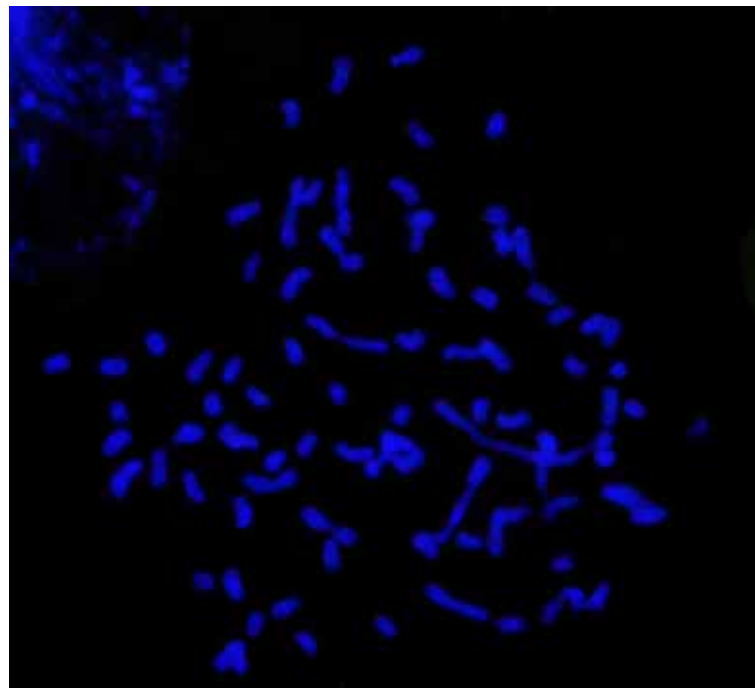


Figura 4 – Metáfase mitótica do híbrido 221 ($2n= 102$ cromossomos) contra corada com DAPI.

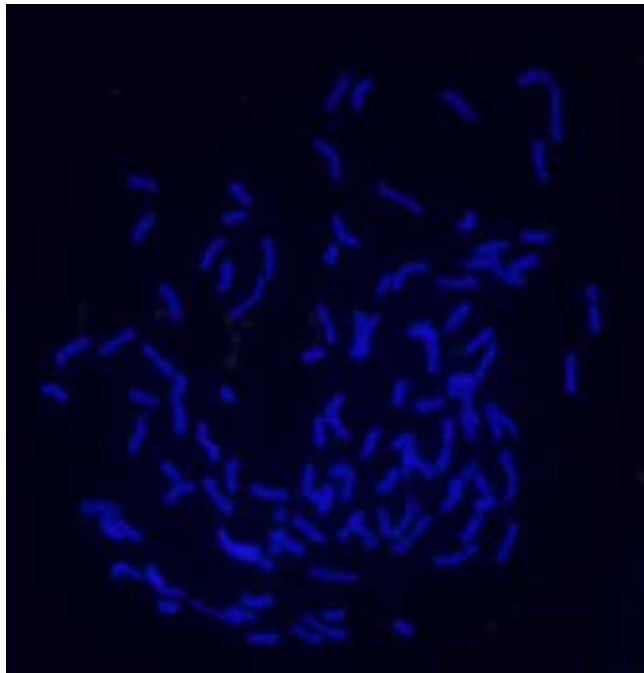


Figura 5 – Metáfase mitótica do híbrido 292 ($2n= 118$ cromossomos) contra corada com DAPI.

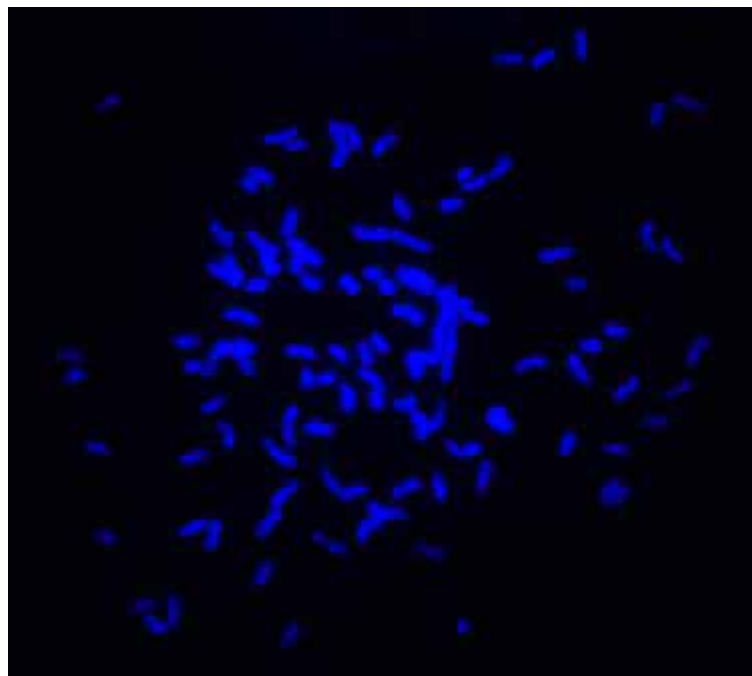


Figura 6 – Metáfase mitótica do híbrido 303 ($2n= 114$ cromossomos) contra corada com DAPI.

De acordo com os números cromossômicos analisados neste trabalho, pode-se afirmar que a transmissão de gametas nos híbridos estudados foi $n+n$, uma vez que a cultivar mãe apresenta número cromossômico variando de $2n=100-130$ e o acesso GlagaH (*S. spontaneum*) possui número cromossômico $2n=112$ cromossomos. Essa informação é importante, uma vez que em cana-de-açúcar é possível se observar a transmissão $2n+n$ em híbridos de *S. officinarum* e *S. spontaneum* (BREMER, 1961, ROACH, 1969). A transmissão de $n+n$ envolvendo cruzamentos entre *S. officinarum* e exemplares de *S. spontaneum* com $2n=112$ cromossomos foi confirmada por D'Hont et al. (1996).

A aplicação da técnica de GISH nos materiais analisados não permitiu a distinção de cromossomos específicos de *S. officinarum* e *S. spontaneum*, isso porque ambas as sondas marcaram todo o genoma dos híbridos. Esse mesmo fato foi observado no trabalho realizado por Cuadrado et al. (2004), de acordo com o qual isso se deveu ao alto grau de homologia das sondas. Os genomas utilizados como sondas nos experimentos de GISH, GlagaH (*S. spontaneum*) e Green German (*S. officinarum*), são materiais antigos classificados como representantes puros de acessos de *S. spontaneum* e *S. officinarum*.

No entanto, devido aos poucos conhecimentos existentes em relação as espécies mais primitivas de cana-de-açúcar, a possibilidade desses materiais serem antigos híbridos não pode ser descartada. Esse fato permite ainda, questionamentos sobre acurácia da técnica de GISH para comprovar a introgressão em híbridos de base genética estreita como em cana-de-açúcar. Questionamentos sobre a sensibilidade dessa técnica em relação a pequenos segmentos de introgressão e sobre as limitações da mesma para detectar genomas relativamente próximo são indicados por Bailey et al. (1993), Schwarzacher et al. (1992) e Cuadrado et al. (2004).

Mesmo com a ausência de especificidade das sondas utilizadas foi possível quantificar a participação de *S. spontaneum* e *S. officinarum* por meio da análise da maior predominância de uma das cores em cada cromossomo analisado. Com isso, verificou-se que para o Clone 292 e para o clone 221 cerca de 60% dos cromossomos são oriundos de *S. spontaneum* e 40% são oriundos de *S. officinarum* (Figura 7 e 8). A sonda *S. spontaneum* marcaram mais fortemente as regiões centroméricas, enquanto a sonda de *S. officinarum* apareceram mais dispersas ao longo do comprimento dos cromossomos.

As participações dos genomas de *S. spontaneum* e *S. officinarum* nos genomas dos híbridos corroboram com os dados obtidos por D'Hont et al., (1996) que confirmam a contribuição de 10% do genoma das cultivares atuais oriundas de *S. spontaneum*, 80% de *S. officinarum* e 10% de recombinantes. Segundo D'Hont (2005), no cultivar NCo376, foi possível se observar as proporções de 20% de *S. spontaneum*, 70 % de *S. officinarum* e 10% de recombinantes no genoma total da espécie. Cuadrado et al. (2004) afirmaram que cerca de 16% dos cromossomos dos cultivares modernos por eles analisados são pertencentes a espécie *S. spontaneum*, 5% são cromossomos recombinantes ou que sofreram translocação, sendo o restante pertencente a *S. officinarum*. De maneira mais geral, Piperidis e D'Hont, (2001) relataram que a proporção completa do genoma de *S. spontaneum* em 7 cultivares de cana-de-açúcar é cerca de 10 e 20% do total dos genomas desses acessos. A porcentagem dos genomas utilizados como sonda confirmam também a transmissão n+n dos gametas envolvidos uma vez que, neste caso, por se tratar do cruzamento entre uma cultivar atual e um clone de *S. spontaneum*, esperava-se cerca de 60-70% dos cromossomos oriundos de *S. spontaneum* e o restante oriundo de *S. officinarum*.

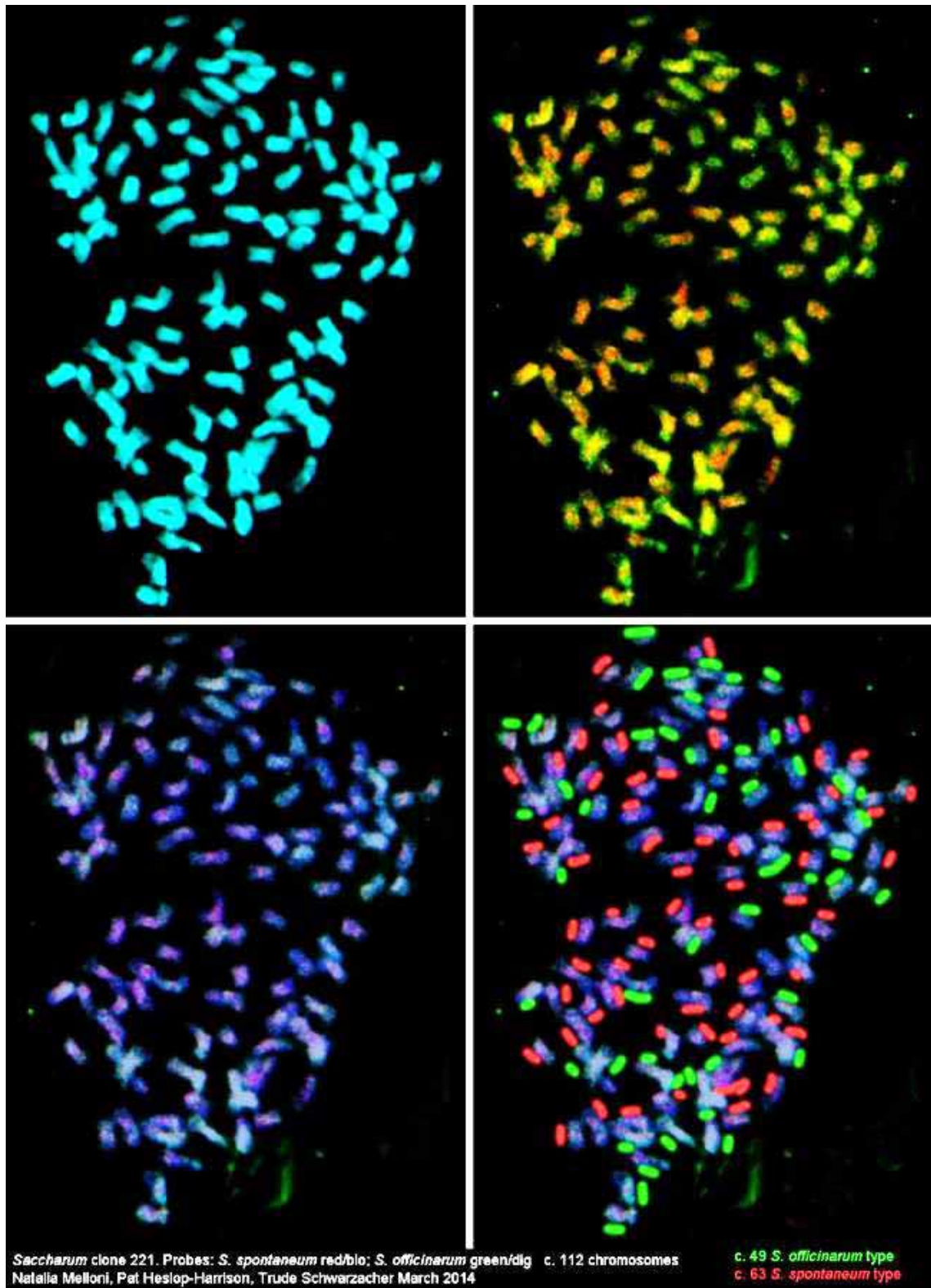


Figura 7- Preparação cromossômica do híbrido 221 ($2n= 112$ cromossomos) depois da GISH utilizando DNA genômico de *S. officinarum* (rotulado com digoxigenina, verde) e DNA genômico de *S. spontaneum* (rotulado com biotina, vermelho) contracorados com DAPI

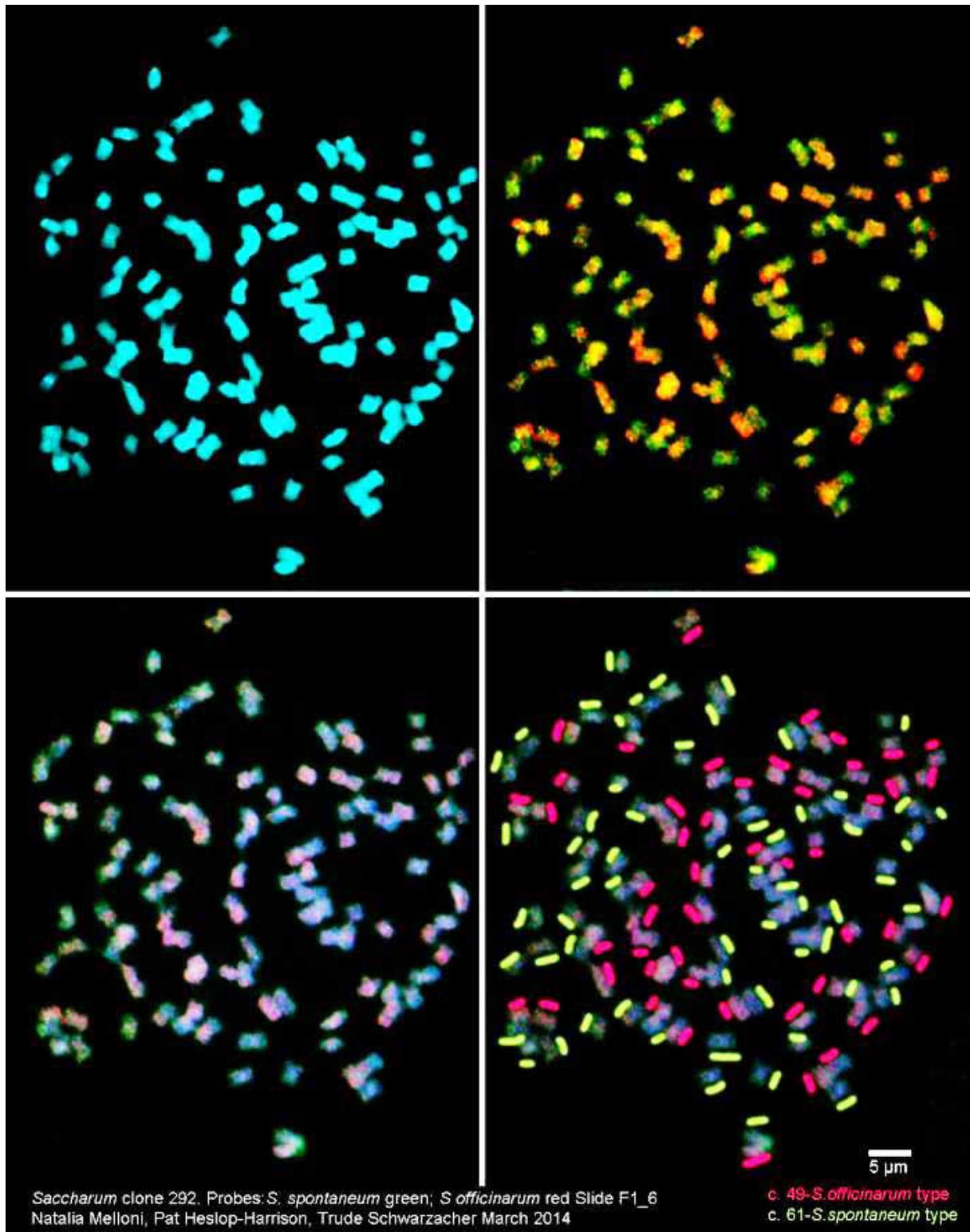


Figura 8- Preparação cromossômica do híbrido 292 ($2n= 110$ cromossomos) depois da GISH utilizando DNA genômico de *S. officinarum* (rotulado com biotina, vermelho) e DNA genômico de *S. spontaneum* (rotulado com digoxigenina, verde) e contracolorados com DAPI.

Os estudos realizados com as sondas 45S e 5S permitiram a observação de 11 sítios de ambos rDNAs para os clones 303, 292 e 221 (Figura 9, 10 e 11). Em algumas lâminas um fraco sinal foi observado em 1 cromossomo podendo indicar um novo sítio.

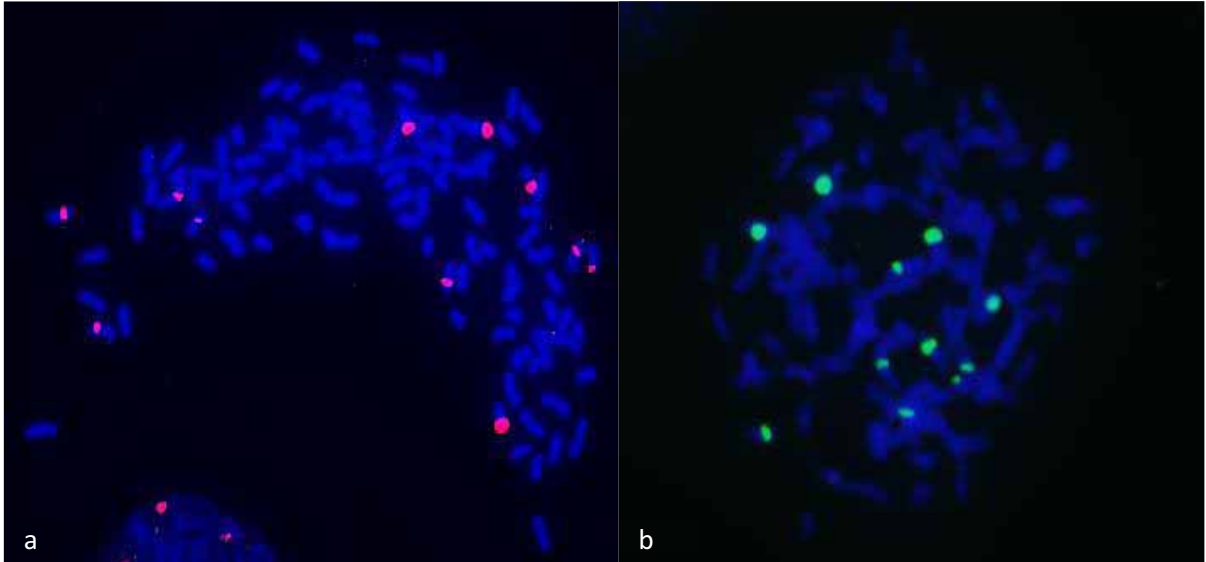


Figura 9 - Sítios de rDNA em cromossomos do híbrido 303 (a) sonda rDNA 45S marcada com biotina, 11 sítios e (b) sonda rDNA 5S marcada com digoxigenina, 11 sítios. Os cromossomos foram contra corados

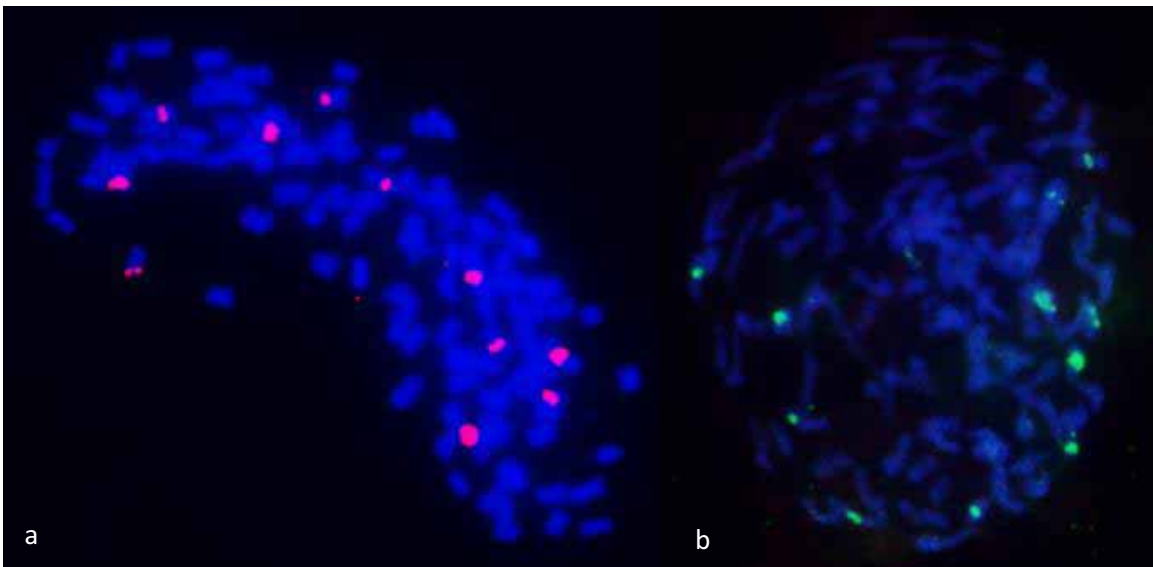


Figura 10- Sítios de rDNA em cromossomos do híbrido 292 (a) sonda rDNA 45S marcada com biotina, 11 sítios e (b) sonda rDNA 5S marcada com digoxigenina, 11 sítios. Os cromossomos foram contra corados com DAPI.

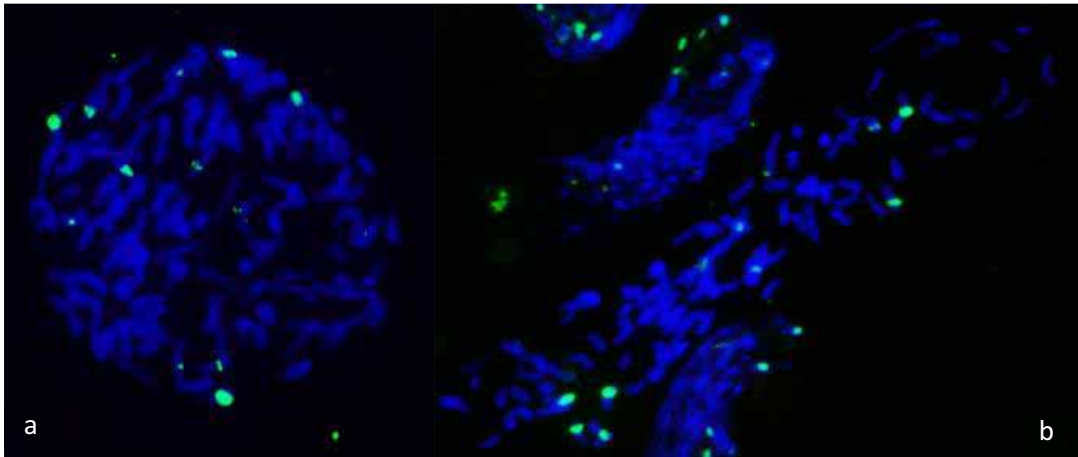


Figura 11 - Sítios de rDNA em cromossomos do híbrido 221 (a) sonda rDNA 5S marcada com digoxigenina, 12 sítios e (b) sonda rDNA 45S marcada com digoxigenina, 11 sítios. Os cromossomos foram contra corados com DAPI.

Em todas as metáfases analisadas é possível a observação de intensidades luminosas diferentes entre os sítios analisados, mostrando maior ou menor presença dessas sondas nos cromossomos observados.

Por apresentarem tamanhos pequenos não foi possível obter informações precisas sobre a posição dos sítios. Estudos em pró-metáfases normalmente geram resultados melhores na caracterização de genes ribossomais e melhor observação de translocação e recombinação de cromossomos (CUADRADO et al., 2004). São poucos os trabalhos que quantificam os sítios de 45S e 5S em cana-de-açúcar. Cuadrado et al. (2004) relataram 10 sítios de rDNA 45S e 5S nas cultivares My5514 e B42231 e 12 sítios na C236-51. Ferrari (2010), quantificou 12 sítios de rDNA 45S e 5S nas cultivares RB72454 e RB835486 e 11 sítios 45S e 9sítios 5S para a cultivar RB867515 (Tabela 1). Os genes ribossomais 45S e 5S são sequencias em tandem com cerca de 10Kb, são altamente conservados e podem ocupar posições diferentes entre as espécies sendo assim podem ser marcadores importantes para estudos evolutivos, como especiação ou a identificação de cromossomos diferenciados entre acessos (HESLOP-HARRISON, 2000; SOARES-SCOTT et al., 2005).

Tabela 1- Número de sítios rDNA 45S e 5S descritos em cultivares de cana-de-açúcar atualmente.

Espécie	Acesso	2n	Sítios rDNA 45S	Sítios rDNA 5S	Referência
<i>S. officinarum</i> x <i>S. spontaneum</i>	My5514	2n ~ 103	10	10	Cuadrado et al., 2004.
	B42231	2n ~ 110	10	10	Cuadrado et al., 2004.
	C236-51	2n ~ 115	12	12	Cuadrado et al., 2004.
	RB72454	2n = 112	12	12	Ferrari, 2010
	RB835486	2n = 112	12	12	Ferrari, 2010
	RB867515	2n = 110	11	9	Ferrari, 2010

A coloração com DAPI foi relativamente uniforme em todo os cromossomos das metáfases observadas. Bandas positivas foram observadas na sua maioria em regiões centroméricas, algumas bandas foram observadas na porção terminal de alguns cromossomos (Figura 12). Essas regiões são ricas em repetições AT indicando famílias de DNA repetitivo que também poderão ser usadas no futuro para estudos evolutivos.

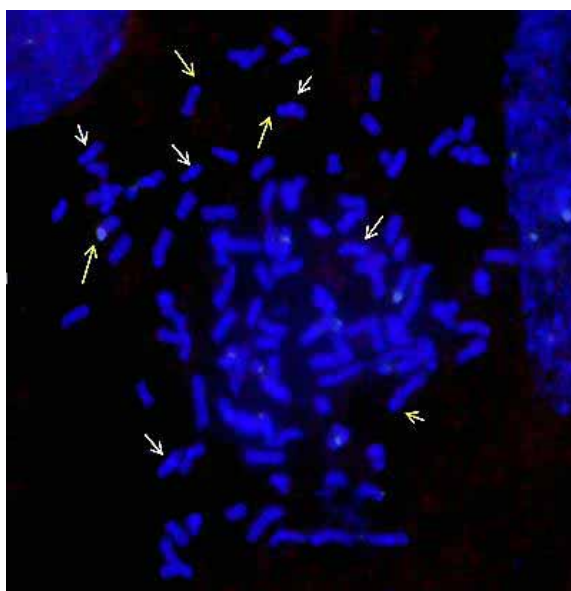


Figura 12 – Metáfase mitótica do híbrido 229 contra corada com DAPI. As setas brancas indicam bandas próximas ao centrômero enquanto as setas amarelas indicam bandas mais terminais.

Os dados obtidos neste estudo fornecem as primeiras informações citogenética sobre híbridos originados de cultivares comerciais com *S. spontaneum* produzidos pelo programa de melhoramento de cana do IAC. Essas informações podem permitir no futuro o desenvolvimento de mapas físicos de conjuntos de cromossomos no gênero *Saccharum* bem como o desenvolvimento de marcadores adicionais, como BACs (D'HONT et al., 1995, D'HONT et al., 1998).

Informações detalhadas sobre o genoma das cultivares modernas de cana são de extrema importância, uma vez que dão uma visão quantitativa da recombinação meiótica e de eventos de translocação na remodelação desse que é um dos genomas mais complexos existentes (CUADRADO et al., 2004).

Conclusões

Marcadores moleculares e o uso da técnica de hibridização *in situ* foram eficientes na confirmação da natureza híbrida e na caracterização dos genótipos oriundos do cruzamento entre cultivares comerciais e acessos de *S. spontaneum*. A transmissão gamética n+n foi confirmada por meio dos trabalhos citogenéticos. Os dados moleculares produzidos aqui também se mostraram eficazes na detecção de pólen exógeno nos cruzamentos analisados.

Referências Bibliográficas

AITKEN, K.; LI, J.; WANG, L.; QING, C.; FAN, Y.; JACKSON, P. Characterization of intergeneric hybrids of *Erianthus rockii* and *Saccharum* using molecular markers. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 54, n. 7, p. 1395-1405, 2007.

BAILEY, J. P.; BENNETT, S. T.; BENNETT, M. D.; STACE, C. A. Genomic *in situ* hybridization identifies parental chromosomes in the wild grass hybrid times *Festulplia hubbardii*. **Heredity**, v. 71, p. 413-420, 1993.

BREMER, G. Problems in breeding and cytology of sugar cane. **Euphytica**, v. 10, n. 1, p. 59-78, 1961.

BROWN, J. S.; SCHNELL, R.; POWER, E.; DOUGLAS, S. L.; KUHN, D. N. Analysis of clonal germplasm from five *Saccharum* species: *S. barberi*, *S. robustum*, *S. officinarum*, *S. sinense* and *S. spontaneum*. A study of inter-and intra species relationships using microsatellite markers. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 54, n. 3, p. 627-648, 2007.

CAI, Q.; AITKEN, K.; DENG, H.; CHEN, X.; FU, C.; JACKSON, P.; MCINTYRE, C. Verification of the introgression of *Erianthus arundinaceus* germplasm into sugarcane using molecular markers. **Plant Breeding**, v. 124, n. 4, p. 322-328, 2005.

COOK, J. H.; BEYEA, J.; KEELER, K. H. Potential impacts of biomass production in the United States on biological diversity. **Annual Review of Energy and the Environment**, v. 16, n. 1, p. 401-431, 1991.

CUADRADO, A.; ACEVEDO, R.; DE LA ESPINA, S. M. D.; JOUVE, N.; DE LA TORRE, C. Genome remodelling in three modern *S. officinarum* × *S. spontaneum* sugarcane cultivars. **Journal of experimental botany**, v. 55, n. 398, p. 847-854, 2004.

D'HONT, A.; RAO, P.; FELDMANN, P.; GRIVET, L.; ISLAM-FARIDI, N.; TAYLOR, P.; GLASZMANN, J. Identification and characterisation of sugarcane intergeneric hybrids, *Saccharum officinarum* × *Erianthus arundinaceus*, with molecular markers and DNA in situ hybridisation. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 91, n. 2, p. 320-326, 1995.

D'HONT, A.; GRIVET, L.; FELDMANN, P.; GLASZMANN, J.; RAO, S.; BERDING, N. Characterisation of the double genome structure of modern sugarcane cultivars (*Saccharum* spp.) by molecular cytogenetics. **Molecular and General Genetics MGG**, v. 250, n. 4, p. 405-413, 1996.

D'HONT, A.; ISON, D.; ALIX, K.; ROUX, C.; GLASZMANN, J. C. Determination of basic chromosome numbers in the genus *Saccharum* by physical mapping of ribosomal RNA genes. **Genome**, v. 41, n. 2, p. 221-225, 1998.

D'HONT, A.; PAULET, F.; GLASZMANN, J. C. Oligoclonal interspecific origin of 'North Indian' and 'Chinese' sugarcane. **Chromosome Research**, v. 10, n. 3, p. 253-262, 2002.

D'HONT, A. Unraveling the genome structure of polyploids using FISH and GISH; examples of sugarcane and banana. **Cytogenetic and genome research**, v. 109, n. 1-3, p. 27-33, 2005.

FERRARI, F. **Caracterização cromossômica em cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*, Poacea)**, 2010, 91 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.

HESLOP-HARRISON, J. Comparative genome organization in plants: from sequence and markers to chromatin and chromosomes. **The Plant Cell Online**, v. 12, n. 5, p. 617-635, 2000.

JACCARD, P. Etude comparative de la distribution florale dans une portion des Alpes et du Jura. **Bulletin de la Societè vaudoise des Sciences Naturelles**, n.37, p.547-579, 1901.

JANK, M. S. Etanol, petróleo e matriz energética. **O Estado de São Paulo**, 09 jun. 2010. Disponível em: <<http://www.unica.com.br/opinia0/show.asp?msgCode={1431D33C-A6BE-4CD3-AC2B-517DB81726F3}>>. Acesso em: 02 de outubro de 2014.

LANDELL, M. G. A.; BRESSIANI, J. A. Melhoramento genético, caracterização e manejo varietal. . In: DINARDO-MIRANDA, L.L; VASCONCELOS, A. C. M.; LANDELL, M. G. A. (Ed.). **Cana-de-açúcar**. Campinas, Instituto Agrônômico, 2008, p.47-56.

MANIGBAS, N.; VILLEGAS, L. Microsatellite markers in hybridity tests to identify true hybrids of sugarcane. **Philippine Journal of Crop Science**, v. 29, n. 2, p. 23-32, 2004.

MCINTYRE, C.; JACKSON, P. Low level of selfing found in a sample of crosses in Australian sugarcane breeding programs. **Euphytica**, v. 117, n. 3, p. 245-249, 2001.

MELLONI, M.; SCARPARI, M.; PINTO, L.; PERECIN, D.; XAVIER, M.; LANDELL, M. Selfing rate estimation in sugarcane under unfavorable natural conditions of crossing by using microsatellite markers. **Genetics and Molecular Research**, v. 13, n. 1, p. 2278, 2014.

PERRIER, X., JACQUEMOUD-COLLET, J.P. **DARwin software**. Disponivel em: <http://darwin.cirad.fr/darwin>. 2006.

PIPERIDIS, G.; D'HONT, A. Chromosome composition analysis of various *Saccharum* interspecific hybrids by genomic in situ hybridisation (GISH). In: International Society of Sugar Cane Technologists. Proceedings of the XXIV Congress, Brisbane, Australia, 17-21 September 2001. Volume 2., Australian Society of Sugar Cane Technologists, p. 565-566, 2001

PIPERIDIS, G.; CHRISTOPHER, M. J.; CARROLL, B. J.; BERDING, N.; D'HONT, A. Molecular contribution to selection of intergeneric hybrids between sugarcane and the wild species *Erianthus arundinaceus*. **Genome**, v. 43, n. 6, p. 1033-1037, 2000.

ROACH, B. Cytological studies in *Saccharum*. Chromosome transmission interspecific and intergeneric crosses. **Int Soc Sugar Cane Technol Proc Congr**, 1969.

SCHWARZACHER, T.; HESLOP-HARRISON, P. **Practical in situ hybridization**. BIOS Scientific Publishers Ltd, 203p., 2000.

SCHWARZACHER, T.; HESLOP-HARRISON, J.; ANAMTHAWAT-JONSSON, K.; FINCH, R.; BENNETT, M. Parental genome separation in reconstructions of somatic and premeiotic metaphases of *Hordeum vulgare* x *H. bulbosum*. **Journal of Cell Science**, v. 101, n. 1, p. 13-24, 1992.

SILVA, V. S.; DA SILVA, C. M. Análise da viabilidade de projetos de cogeração de energia por meio do bagaço da cana-de-açúcar: um estudo a partir de agroindústrias sucroalcooleiras do paraná. **Campo Digital**, v. 8, n. 2, 2013.

SOARES-SCOTT, M. D.; MELETTI, L.; BERNACCI, L. C.; PASSOS, I.; FALEIRO, F.; JUNQUEIRA, N.; BRAGA, M. Citogenética clássica e molecular em passifloras. **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético. Embrapa Cerrados, Planaltina**, p. 213-240, 2005.

UNICA - **União da Indústria da Cana-de-açúcar**. Disponível em: <
[http://www.unica.com.br/Downloads/estudosmatrizenergetica/pdf/MATReenerget_FIN
AL_WEB.pdf](http://www.unica.com.br/Downloads/estudosmatrizenergetica/pdf/MATReenerget_FIN
AL_WEB.pdf).> Acesso em 10 fev. 2011.

XAVIER, M.A. PINTO, L.R. FÁVERO, T.M. CARLINI-GARCIA, L.A. LANDELL, M.G.A. Paternity identification in sugarcane polycrosses by using microsatellite markers. *Genetics and Molecular Research*, v. 13, n. 1, p. 2268-2277, 2014.

ZHANG, H.; HE, L.; ZHONG, H.; LI, F.; HE, S.; YANG, Q. Identification of intergeneric hybrids between *Saccharum* spp. and *Erianthus fulvus* with ITSs. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 9, p. 1841-1845, 2009.