

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

**CARACTERIZAÇÃO DA DIVERSIDADE EPIGENÉTICA DE
CANA-DE-AÇÚCAR VIA MSAP (*Methylation sensitive
amplification polymorphism*)**

**Alessandra Alves Martins
Engenheira Agrônoma**

2018

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

**FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**CARACTERIZAÇÃO DA DIVERSIDADE EPIGENÉTICA DE
CANA-DE-AÇÚCAR VIA MSAP (*Methylation sensitive
amplification polymorphism*)**

Alessandra Alves Martins

Orientadora: Prof. Dra. Luciana Rossini Pinto

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas).

2018

M379c Martins, Alessandra Alves
Caracterização da diversidade epigenética de cana-de-açúcar via
MSAP (*Methylation sensitive amplification polymorphism*) / Alessandra
Alves Martins. – – Jaboticabal, 2018
vi, 60 p. : Il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2018
Orientadora: Luciana Rossini Pinto
Banca examinadora: Dilermando Perecin, Maria Natália Guindalini
Melloni.
Bibliografia

1. Cana-de-açúcar. 2. Metilação de DNA. 3. MSAP. 4. Epigenética.
I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 633.61

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



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: CARACTERIZAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE ACESSOS DE CANA-DE-AÇÚCAR VIA MSAP (*Methylation sensitive amplification polymorphism*)

AUTORA: ALESSANDRA ALVES MARTINS

ORIENTADORA: LUCIANA ROSSINI PINTO

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

Pesquisadora Dra. LUCIANA ROSSINI PINTO
Centro Avançado de Pesquisa Tecnológica do Agronegócio de Cana / IAC - Ribeirão Preto/SP

Pesquisadora Dra. MARIA NATÁLIA GUINDALINI MELLONI
Centro de Cana / IAC / Ribeirão Preto/SP

Prof. Dr. DILERMANDO PERECIN
Departamento de Ciências Exatas / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 29 de junho de 2018

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

ALESSANDRA ALVES MARTINS – nascida em 07 de maio de 1992, Uberlândia (MG), Brasil. Ingressou no curso de Agronomia da Universidade Federal de Uberlândia em 2010. Durante a graduação, foi bolsista CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), desenvolvendo estudos na área de fitobacteriologia. Obteve o título de Engenheira Agrônoma em dezembro de 2015. Em 2016, ingressou na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Campus de Jaboticabal no curso de Mestrado em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas), sendo bolsista CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), desenvolvendo trabalhos na área de análises moleculares epigenéticas de cana-de-açúcar, sob a orientação da Dra. Luciana Rossini Pinto.

“Não há nenhum lugar que você possa estar,
que não é onde você deveria estar.”

All you need is love - The Beatles

“Dedico aos meus pais, Dorvalina e Vandeir, por sempre desejarem o melhor pra mim, confiarem em minhas escolhas e, nem por um segundo, me deixarem desistir dos meus sonhos ”

AGRADECIMENTOS

Á Deus, por se fazer sempre presente em minha vida, ouvindo os meus anseios, amparando minhas escolhas e me cercando de pessoas maravilhosas.

Á Universidade Estadual Paulista (Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal – FCAV/UNESP) e aos seus docentes pelos ensinamentos oferecidos, contribuindo para minha formação e crescimento pessoal.

Á Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de estudos de mestrado.

Ao IAC, Centro de Cana de Ribeirão Preto, pelo apoio estrutural, operacional e financeiro, que permitiu o desenvolvimento deste trabalho.

Á meus pais, Dorvalina e Vandeir, que, mesmo longe, foram fundamentais para a conclusão deste trabalho. As inúmeras palavras amigas, o amor incondicional e a devoção para que sempre alcançasse o melhor jamais serão esquecidas.

Á minha irmã Natália, por ser uma fonte de inspiração de dedicação à profissão, pela amizade de todos esses anos e pelos presentes mais especiais que já recebi, Mirya e Benjamim, que são a alegria de nossas vidas.

Á minha vó, Cinira, e demais familiares que sempre torceram pelo meu sucesso. Pelo apoio incondicional e orações que me fortaleceram sempre que pensava em desistir.

Á Hugo, por ser meu companheiro de vida, pelas inúmeras visitas, por sempre se mostrar disposto a me escutar e me acalmar nos momentos de tensão. Seu amor se fez fundamental na construção de mais essa etapa.

Á Dra. Luciana Rossini, pois além dos ensinamentos durante esses dois anos teve paciência e disponibilidade em me ajudar nos momentos de dúvida, sempre ofereceu palavras amigas, apoio e acreditou em meu potencial, tornando-se uma grande amiga.

Á equipe do laboratório de biotecnologia do IAC, pesquisadores, técnicos, funcionários e alunos, por me receberem e fazerem parte do meu dia a dia. Em especial, agradeço a Thaís, Juliana e Maicon pelo apoio nas análises do laboratório, pelo tempo dedicado e pelos diversos ensinamentos que levarei

comigo para sempre. Ao Marcel e ao João por me ajudarem na execução dos programas para genotipagem e análise de dados. O apoio de todos foi fundamental para a conclusão dessa etapa e jamais me esquecerei de cada um de vocês.

Às minhas queridas amigas, Izadora (Iza), Maria Natália (Nat) e Michelle (Mi), pelos inúmeros almoços, doces, discussões sobre assuntos de suma importância e todos os “pós lab”, que fizeram meus dias em Ribeirão Preto e região muito mais alegres e cheios de histórias que sempre levarei comigo. Obrigada por me permitirem entrar em suas vidas e por fazerem parte da minha caminhada.

À Sophia, Antônio, Elise, Kian e meus amigos de pós graduação de Jaboticabal, que tornaram meus dias muito mais divertidos. Guardarei para sempre nossas recordações e nossa amizade.

À meus amigos da 49ª turma de Agronomia da UFU que, mesmo em caminhos distintos, continuam torcendo pelo meu sucesso. Em especial, agradeço a Marcela pela amizade de tantos anos, por todos os momentos de descontração, pelo apoio e por permitir que eu dividisse minhas aflições sempre que necessário.

E a todos aqueles que de alguma forma, mesmo que pequena, contribuíram para a conclusão de mais esse desafio.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	iii
ABSTRACT	iv
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. Cana-de-açúcar: características gerais da cultura e importância econômica ...	4
2.2. Origem da cana-de-açúcar e o “complexo <i>Saccharum</i> ”	6
2.3. Cana-energia e a plasticidade fenotípica	9
2.4. Avaliação da diversidade de acessos exóticos via marcadores moleculares .	11
2.5. Epigenética e metilação em plantas.....	14
2.6. Técnica de MSAP	16
3. MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1. Genótipos.....	19
3.2. Extração de DNA	20
3.3. Técnica de MSAP	20
Digestão do DNA com endonucleases de restrição.....	20
Ligação dos adaptadores e pré-amplificação	21
Amplificação e combinação seletiva MSAP	22
Genotipagem e estabelecimento dos perfis moleculares	23
3.4. Análise de dados.....	24

4. RESULTADOS	27
4.1. Análise de polimorfismos MSAP	27
4.2. Avaliação dos níveis de metilação entre grupos de acessos	29
4.3. Metilação total relativa	32
4.4. Análise da estrutura epigenética	36
5. DISCUSSÃO	42
6. CONCLUSÃO	48
7. REFERÊNCIAS	49

CARACTERIZAÇÃO DA DIVERSIDADE EPIGENÉTICA DE CANA-DE-AÇÚCAR VIA MSAP (*Methylation sensitive amplification polymorphism*)

RESUMO – A busca por fontes de energia renováveis desperta o interesse em uma das principais culturas exploradas no Brasil, a cana-de-açúcar. As cultivares modernas derivaram de cruzamentos interespecíficos principalmente entre *Saccharum officinarum* e *S. spontaneum* nos quais poucos acessos destas espécies foram utilizados, proporcionando uma base genética estreita. Porém, existe uma vasta variabilidade genética e epigenética dentre os acessos que compõem o “complexo *Saccharum*” que ainda não foi explorada nos programas de melhoramento. A metilação do DNA, uma das principais modificações epigenéticas ocorrentes em plantas, pode ser quantificada pela técnica de MSAP (*Methylation sensitive amplification polymorphism*). Neste contexto, este trabalho teve como objetivo estimar a diversidade epigenética das espécies *S. officinarum*, *S. spontaneum*, *S. robustum*, *S. barberi*, *Erianthus* sp. e cultivares comerciais via marcadores MSAP. Para isso, duas amostras de cada acesso foram digeridas com as enzimas de restrição EcoRI-MspI e EcoRI-HpaII, ligadas aos respectivos adaptadores e submetidas as ampliações pré-seletivas e seletivas. Os padrões de metilação foram estimados, classificando os marcadores quanto ao número de loci suscetíveis (MSL) e não suscetíveis a metilação (NML). As relações de dissimilaridade entre os acessos assim como a distribuição da variabilidade epigenética dentre e entre os grupos das espécies foram analisadas. No total, foram obtidos 1341 loci, sendo que a diversidade foi significativamente maior nos MSL, resultando em uma maior variabilidade no epigenoma. A maioria dos polimorfismos identificados nos seis grupos analisados derivaram da metilação da citosina externa. A frequência de loci metilados variou significativamente entre os grupos de acordo com a combinação seletiva de primers utilizada. Os acessos foram divididos em duas subpopulações, com maior variabilidade epigenética dentro dos grupos investigados. Os marcadores MSAP avaliados indicaram uma diferença epigenética moderada entre as espécies. Os resultados obtidos sinalizaram que existem diferenças nos padrões de metilação entre as espécies que constituem o germoplasma básico da cana-de-açúcar e as cultivares comerciais, podendo esta modificação epigenética ser explorada nos programas de melhoramento da cultura.

Palavras-chave: cana-de-açúcar, metilação de DNA, MSAP, epigenética

CHARACTERIZATION OF EPIGENETIC DIVERSITY OF SUGARCANE BY USING MSAP (*Methylation sensitive amplification polymorphism*)

ABSTRACT - The search for renewable energy sources has promoted the interest in one of the main crops explored in Brazil, the sugarcane. Modern sugarcane cultivars derived from interspecific crosses, mainly between *Saccharum officinarum* and *S. spontaneum* in which few accessions of these species were involved leading to a narrow genetic base. However, there is a huge genetic and epigenetic variability among the accessions of the “*Saccharum* complex” that has not yet been explored in the breeding programs. The DNA methylation, one of the main epigenetic modifications that occur in plants, can be quantified by using the MSAP (*Methylation sensitive amplification polymorphism*) technique. In this context, this study aimed to estimate the epigenetic diversity of *S. officinarum*, *S. spontaneum*, *S. robustum*, *S. barberi*, *Erianthus* sp. species and commercial cultivars by using MSAP derived markers. Two DNA samples of each accession were separately digested with the restriction enzymes *EcoRI*-*MspI* and *EcoRI*-*HpaII*, ligated to adapters followed by pre-selective and selective amplification. The methylation patterns were estimated by classifying the markers based on the number of Methylation-Susceptible Loci (MSL) and Non-Methylated Loci (NML). The dissimilarity relations and variability distribution within and between the accessions was evaluated. A total of 1341 loci were obtained and the diversity was significantly higher in MSL, resulting in a higher variability in the epigenome. Most of the polymorphisms observed in the group of accessions was due to external cytosine methylation. The frequency of methylated loci significantly varied among the groups according to the selective primer combination. The accessions were divided in two subpopulations, with a higher epigenetic variability within the investigated groups. Moderate epigenetic difference among the species was observed. Our results signals differences in methylation patterns among the species that constitute the sugarcane basic germplasm and commercial cultivars, being that this epigenetic modification can be exploited by the sugarcane breeding programs.

Keywords: sugarcane, DNA methylation, MSAP, epigenetic

1. INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) é uma das espécies cultivadas com maior importância nos países tropicais e subtropicais, devido a sua múltipla utilidade e elevado potencial produtivo de açúcar, etanol e biomassa (HITCHCOCK, 1923; BONNETI et al., 2004). O Brasil é o maior produtor da cultura, com rendimento estimado para a safra 2016/17 de 694,5 milhões toneladas, 4,4% maior que a safra anterior (CONAB, 2017).

Dentre os objetivos dos programas de melhoramento de cana-de-açúcar, o desenvolvimento de cultivares com elevado potencial energético vem sendo cada vez mais explorado (LANDELL; BRESSIANI, 2010). A introgressão de genes através de hibridações interespecíficas entre gêneros e espécies distintas provenientes do “complexo *Saccharum*” é uma alternativa para elevar teores de fibras de novas cultivares para o desenvolvimento da chamada “cana-energia”. Cruzamentos entre cultivares comerciais e acessos de *Saccharum spontaneum*, *S. robustum* e do gênero *Erianthus*, que são ricos em biomassa e apresentam elevada capacidade de perfilhamento e vigor, é uma alternativa para o melhoramento da cultura visando a produção de energia (CAI et al., 2005; MING et al., 2006; AITKEN; MCNEIL, 2010). Dentro do gênero *Saccharum*, indivíduos da espécie *S. spontaneum* vêm se destacando como genitores em programas de melhoramento para o desenvolvimento de cana-energia, devido a sua elevada plasticidade fenotípica e adaptação em diferentes ambientes (VALLADARES et al., 2007; MATSUOKA et al., 2014; DA SILVA, 2017). Os organismos poliploides podem apresentar diferentes níveis de plasticidade fenotípica devido à redundância genômica dos mesmos e interações genéticas e epigenéticas, permitindo o estabelecimento de novos genótipos adaptados a ambientes distintos (PIGLIUCCI; MURREN; SCHLICHTING, 2006; HAHN; KLEUNEN; SCHÄRER, 2012; DUNCAN; GLUCKMAN; DEARDEN, 2014; SONG; CHEN, 2015).

A diversidade genética e epigenética, segundo Schulz, Eckstein e Durka (2014), estão diretamente interligadas e são capazes de gerar fenótipos com diferentes níveis de adaptação a ambientes distintos. A caracterização de espécies ao

nível genético e epigenético é de extrema importância, uma vez que permite estimar a contribuição de ambos os processos para originar um fenótipo. Estas alterações devem ser consideradas na seleção de acessos pertencentes ao “complexo *Saccharum*” para introgressão no melhoramento da cana-de-açúcar visando à produção de biomassa, uma vez que estudos com outras espécies, como *Arabidopsis*, comprovaram que as mesmas estão diretamente interligadas a esta característica, promovendo um aumento de cerca de 40% de massa seca em relação as populações padrão (D’ALESSIO; SZYF, 2006; JONES; SUNG, 2014; GUARINO et al., 2015).

A metilação do DNA, um dos principais processos responsáveis pelas alterações epigenéticas, atua na modulação e controle da expressão gênica nos organismos sem alterar o código genético, sendo esta condição herdável (SCHULZ; ECKSTEIN; DURKA, 2013). Dentre as técnicas disponíveis para o estudo da metilação do DNA (KURDYUKOV; BULLOCK, 2016), a técnica de MSAP (*Methylation sensitive amplification polymorphism*) permite a caracterização epigenética de indivíduos mesmo na ausência de um genoma de referência previamente sequenciado (ALONSO et al., 2016) de forma rápida e com baixo custo através da utilização de enzimas de restrição, tal como os isosquisomeros *HpaII* e *MspI* que reconhecem e clivam de forma diferenciada a citosina metilada no DNA. A técnica de MSAP proporciona um elevado número de marcas, sendo eficiente na determinação da diversidade epigenética entre e dentro de diferentes espécies (LIMA et al., 2002).

Nesse sentido, estudos de caracterização de germoplasma tanto ao nível fenotípico como molecular são fundamentais para o gerenciamento dos bancos de germoplasma e sua utilização pelos programas de melhoramento genético. A caracterização de acessos de germoplasma básico e comercial de cana-de-açúcar tem sido bem explorada via marcadores moleculares cujas técnicas empregadas revelam polimorfismos nas sequências do DNA (BROWN et al. 2007, CHANG et al. 2012, NAYAK et al. 2014). Entretanto, a investigação da variabilidade genética de germoplasma de cana-de-açúcar com foco nas regiões metiladas do genoma, bem como a sua magnitude entre as principais espécies que compõe o gênero *Saccharum*, e que são de interesse para o melhoramento da cana-de-açúcar, ainda não foi realizada.

Este estudo teve como objetivo investigar a diversidade genética ao nível de epigenoma das espécies de *Saccharum officinarum*, *S. spontaneum*, *S. robustum*, *S. barberi*, *Erianthus* sp. e cultivares comerciais via marcadores MSAP, estimando os níveis e padrões de metilação dentro e entre as espécies mencionadas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Cana-de-açúcar: características gerais da cultura e importância econômica

A cana-de-açúcar é uma planta monocotiledônea, perene e alógama, que apresenta de 2,8 a 17,6% de taxa de autofecundação (BARBOSA et al., 2005; CAIEIRO et al., 2010). Comercialmente a cultura é multiplicada por propagação vegetativa, utilizando toletes (colmos) ou mudas pré-brotadas.

Representante da família Poaceae, tribo Andropogoneae e gênero *Saccharum* (que em latim significa “açúcar”), a cana-de-açúcar foi descrita primeiramente por Linnaeus em 1753 (HITCHCOCK, 1923; DANIELS; ROACH, 1987).

Com metabolismo C4, a cana-de-açúcar apresenta alta taxa fotossintética e elevada capacidade de fixação de CO₂, sendo bastante eficiente no uso da água, com crescimento expressivo e ausência de fotorrespiração. A cultura apresenta boa adaptação em ambientes com condições adversas, tais como variações bruscas de temperatura, elevada intensidade luminosa e escassez de água (CASAGRANDE; VASCONCELOS, 2008; MANHÃES et al., 2015).

A planta se desenvolve formando perfilhos, o que diferencia o manejo de produção de cada cultivar, uma vez que isto afeta o número de gemas que serão utilizadas por metro no plantio e a capacidade de rebrota da mesma. Este perfilhamento é afetado por características ambientais, como luz, temperatura, umidade do solo e nutrição (SCARPARI; BEAUCLAIR, 2008).

Cada cultivar apresenta características morfológicas particulares, como formato de colmo, nós e folhas. Segundo Scarpari e Beauclair (2008), os colmos são compostos por nós e entrenós, apresentando diferentes formatos, cores e aparências que auxiliam na identificação e descrição dos genótipos. O colmo contém cerca de 13% de açúcar, 12% de fibras, 75% de água e uma pequena quantidade de cinzas. Para a indústria açucareira esta é considerada a parte mais importante da planta e, assim como o perfilhamento, seu crescimento é afetado por fatores ambientais (HENRY, 2010).

As folhas da cana-de-açúcar são alternadas e opostas, sendo presas aos nós dos colmos. Compostas por lâmina (parte superior) e bainha (parte inferior), as folhas contêm sílica em suas bordas e bainha aberta, podendo apresentar tricomas, dependendo da cultivar, que recebem o nome de joçal (CHEAVEGATTI-GIANOTTO et al., 2011).

A inflorescência da planta é ramificada, conoidal, tipo panícula ou flecha, com flores hermafroditas com um óvulo. O florescimento da cana-de-açúcar é indesejável em áreas de cultivo comercial, pois este processo demanda muita energia da planta, reduzindo o teor de sacarose, crescimento vegetativo e a qualidade da matéria-prima da mesma. Porém, para os programas de melhoramento, o florescimento é um processo fisiológico essencial, uma vez que a variabilidade é ampliada via cruzamento (SCARPARI; BEAUCLAIR, 2008; CHEAVEGATTI-GIANOTTO et al., 2011; DE MORAIS et al., 2015).

O sistema radicular é composto por raízes superficiais, de sustentação e raízes de cordão, sendo a última raramente encontrada, e tem como principais funções dar sustentação à planta, absorver água e nutrientes. A cana planta ou cana de primeiro corte tem menor quantidade de raízes, porém essas são mais eficientes na absorção de água e nutrientes. Já a cana soca (a partir do segundo corte) apresenta mais raízes, porém essas são muito lignificadas, dificultando a absorção. Além disso, ocorrem diferenças entre espécies, sendo que algumas apresentam menos raízes, como é o caso de *Saccharum officinarum* (SCARPARI; BEAUCLAIR, 2008).

Devido ao alto nível de poliploidia, esta é uma cultura com elevada complexidade genômica. Todas as espécies do gênero *Saccharum* são poliploides, possibilitando várias combinações alélicas em um mesmo locus durante a fecundação, obtendo assim diversos fenótipos a partir do cruzamento de genitores contrastantes. Porém, o nível de ploidia e o tamanho do genoma variam de acordo com a cultivar e a espécie em questão (SHAH et al., 2009; HENRY, 2010; LEMOS; STRADIOTTO, 2012).

A cana-de-açúcar foi introduzida no Brasil em 1532, a partir de mudas provenientes da Ilha da Madeira, Portugal. Apesar das dificuldades de implantação da cultura no país, em menos de cinco décadas o Brasil se tornou o maior produtor

mundial de açúcar, devido às características climáticas favoráveis e solos férteis (FIGUEIREDO, 2008).

Atualmente o Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, seguido pela Índia e China. A área colhida na safra 2016/17 foi de 9,1 milhões de hectares distribuídos entre todos os estados produtores, 5,3% maior que a safra 2015/16, e a produtividade de 76.232 kg/ha. São Paulo, Goiás e Minas Gerais são os principais estados produtores de cana, somando 76,5% da produção nacional (CONAB, 2017). Cerca de 70% da produção mundial de açúcar provém da moagem da cana-de-açúcar, segundo Shah et al. (2009), sendo o Brasil responsável por 40% dessa produção. Através do esmagamento da cana são obtidos açúcar e etanol, segundo a EPE (2016), tendo como produtos primários o caldo da cana, melaço, bagaço, pontas, folhas e olhaduras, e como secundários o etanol anidro e hidratado.

2.2. Origem da cana-de-açúcar e o “complexo *Saccharum*”

O centro de origem da cana é incerto, ocorrendo divergências entre vários autores. O sudeste asiático é tido como região nativa da cana-de-açúcar devido às diversas evidências presentes nas ilhas do Arquipélago da Polinésia, Nova Guiné e Índia (FIGUEIREDO, 2008). Segundo Daniels, Smith e Paton (1975), Mukerjee em 1957 relatou que *Saccharum officinarum* é conhecida a 6000 anos a.C. em Assam e Bengala, sendo a capital da última chamada anteriormente de “Gur”, que significa “cidade do açúcar” (FIGUEIREDO, 2008).

Os centros de diversidade variam de acordo com as espécies de cana-de-açúcar, sendo os de *S. officinarum* e *S. robustum* na Nova Guiné, *S. sinense* na China, de *S. spontaneum* e *S. barberi* no norte da Índia (DANIELS; ROACH, 1987).

Segundo Cheavegatti-Gianotto et al., (2011), a diversidade das cultivares atuais de cana-de-açúcar ocorrem devido à interação de um grupo de diferentes gêneros que apresentam relações filogenéticas muito próximas, permitindo que ocorram hibridações entre si. Composto pelos gêneros *Saccharum*, *Erianthus* Michx.,

Sclerostachya Anderss. Ex Hackel, *Narenga* Bor e *Miscanthus* Anderss, este grupo recebe o nome de “complexo *Saccharum*”.

Todas as espécies deste complexo têm altos níveis de ploidia e são intercruzáveis, sendo os acessos destas utilizados nos programas de melhoramento para ampliar a variabilidade genética e para a introgressão de genes que conferem características agrônômicas de interesse, tais como resistência a estresses abióticos e bióticos, fontes de fibra e sacarose (AMARAL; SANTOS; BARBOSA, 2015). Segundo Aitken e McNeil (2010), acessos de *Erianthus* vêm sendo usados em programas de melhoramento como fonte de ampliação da base genética e os de *Miscanthus* para o desenvolvimento de culturas bioenergéticas, como o sorgo e a cana.

O gênero *Saccharum* é dividido em seis espécies, sendo duas selvagens (*Saccharum spontaneum* L., e *S. robustum* Brandes e Jeswiet ex Grassl) e quatro cultivadas (*S. officinarum* L., *S. sinense* Roxb, *S. barbieri* Jesw e *S. edule* Hassk) (AITKEN; MCNEIL, 2010).

Saccharum spontaneum é a espécie com maior distribuição geográfica do gênero e é extremamente polimórfica, podendo ser cultivada em diferentes regiões do mundo. Considerada uma das espécies com maior contribuição genética às novas cultivares de cana-de-açúcar, *S. spontaneum* apresenta indivíduos poliploides com número cromossômico ($2n$) que varia de 40 a 128 e citótipos com número básico de 8 cromossomos, podendo ter desde indivíduos pentaplóides até hexadecaplóides (AITKEN; MCNEIL, 2010; CHEAVEGATTI-GIANOTTO et al., 2011).

Segundo Panje e Babu (1960), esta espécie tem a capacidade de se adaptar em ambientes com condições extremas, sendo encontrada em regiões com diferentes altitudes, em climas tropicais e temperados, e latitudes variando de 8° sul a 40° norte, abrangendo desde ilhas ao Sul do Pacífico até os países do Mediterrâneo.

A planta de *S. spontaneum* se desenvolve em touceiras, com colmos curtos e finos (diâmetro máximo de 1,5 cm) ou ausentes, em hábito ereto, atingindo, em média, 2,0 a 3,5 metros, com inflorescência e folhas estreitas. A espécie apresenta perfilhamento intenso, rizoma vigoroso e distribuição invasiva no solo. É extremamente usada nos programas de melhoramento devido às suas características rústicas, como alto teor de fibras, baixo teor de sacarose, alto vigor e resistência a

pragas e doenças (ROACH, 1989; AUSTRALIAN GOVERNMENT, 2008; AITKEN; MCNEIL, 2010).

Saccharum robustum, assim como *S. spontaneum*, é uma espécie selvagem, porém apresenta variabilidade intermediária entre os acessos, contribuindo em menor escala no desenvolvimento de novas cultivares. Os genótipos desta espécie, diferente da anterior, apresentam dois números cromossômicos ($2n$), 60 e 80, sendo o número básico de cromossomos igual a 10 (GARCIA et al., 2013). Morfologicamente esta espécie tem colmos grossos e longos, com diâmetro entre 2,0 e 4,4 cm e até 10 metros de altura, baixo índice de açúcar e alto conteúdo de fibras, não apresentando rizoma, porém com um bom desenvolvimento em ambientes tropicais úmidos. Considerada suscetível ao vírus do mosaico, esta espécie participou da genealogia de poucas cultivares atuais (GRIVET; DANIELS; D'HONT, 2004; CHEAVEGATTI-GIANOTTO et al., 2011).

Considerada uma “cana nobre”, acredita-se que *Saccharum officinarum* seja proveniente de hibridações entre genótipos de *S. robustum*, devido a maior proximidade genética da mesma em relação a esta. Segundo Lu et al. (1994), análises utilizando a técnica de RFLP comprovaram que a similaridade entre as duas espécies é a mesma obtida entre dois clones de *S. robustum*.

Com número cromossômico ($2n$) igual a 80 e número básico de 10, *S. officinarum*, assim como *S. spontaneum*, participou na maioria dos cruzamentos das cultivares atuais de cana-de-açúcar, devido as suas características de interesse agrônomo, como pureza de caldo, produção de sacarose e teor de fibra adequado para moagem (LU et al., 1994).

Esta espécie apresenta folhas largas, colmos grossos (aproximadamente 3,5 cm), alto nível de sacarose e baixo conteúdo de fibras, sistema radicular pouco desenvolvido, apresentando bom crescimento em áreas com alta fertilidade e disponibilidade de água. Porém, *S. officinarum* é extremamente suscetível a doenças, como mosaico e gomose, sendo necessário o cruzamento desta com outras espécies do gênero para a incorporação de resistência nas cultivares (DANIELS; ROACH, 1987; SCARPARI; BEAUCLAIR, 2008; CHEAVEGATTI-GIANOTTO et al., 2011).

Saccharum sinense e *Saccharum barberi* são espécies extremamente semelhantes morfolologicamente devido ao fato de ambas serem provenientes de

cruzamentos entre *S. officinarum* e *S. spontaneum*. Através de experimentos de hibridação de cromossomos *in situ*, D'Hont, Paulet e Glaszmann (2002) comprovaram a hipótese desenvolvida por Brandes em 1956 de que *S. officinarum* tenha sido transportada à Ásia e sofrido hibridações naturais com *S. spontaneum*, resultando nas duas espécies.

Os acessos de *Saccharum sinense* apresentam número cromossômico (2n) variando de 116 a 120, enquanto que *S. barberi* apresenta genótipos com número cromossômico (2n) entre 81 e 124 (NAIR et al., 1999; AITKEN; MCNEIL, 2010). Porém, estas espécies não foram muito utilizadas no desenvolvimento das cultivares modernas de cana-de-açúcar, pois a maioria dos genótipos têm baixa taxa de florescimento, impossibilitando o cruzamento com outros materiais (CHEAVEGATTI-GIANOTTO et al., 2011).

Com colmos longos, atingindo até 5,0 metros, e finos (cerca de 2,0 cm de diâmetro), essas espécies apresentam diversos perfilhos, baixo teor de sacarose e alto conteúdo de fibras, sendo bastante tolerantes a estresses bióticos e abióticos (AITKEN; MCNEIL, 2010; CHEAVEGATTI-GIANOTTO et al., 2011).

Dentre as seis espécies do gênero *Saccharum* que fazem parte do complexo, *Saccharum edule* é a única espécie estéril, apresentando inflorescências abortivas. Com origem controversa, acredita-se que a espécie tenha originado através do cruzamento de genótipos de *S. officinarum*, *S. robustum* e outro gênero do complexo, como *Miscanthus*, ou através de mutações de genótipos de *S. robustum* (LU et al., 1994; IRVINE, 1999). Com exemplares com número cromossômico (2n) de 60, 70 e 80, esta espécie não é utilizada nos programas de melhoramento, uma vez que a característica abortiva da inflorescência impede a formação de híbridos (ALWALA; KIMBENG, 2010).

2.3. Cana-energia e a plasticidade fenotípica

A busca por fontes de energia renováveis e com baixo índice de poluição tem aumentado o uso da biomassa da cana-de-açúcar, uma alternativa viável na

diminuição do uso de combustíveis fósseis. A “cana-energia” destaca-se devido ao seu conteúdo de fibras ser duas vezes maior do que o da cana convencional, gerando mais etanol com a mesma quantidade de material (KIM; DAY, 2010). No Brasil existem programas de melhoramento que visam à produção de cana-energia em empresas privadas e nos programas mais tradicionais, como o Centro de Tecnologia Canavieira (CTC), Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) e Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroenergético (RIDESA).

Híbridos que apresentam *Saccharum spontaneum* como um dos genitores têm maior teor de fibras, alto vigor, elevada quantidade de biomassa e baixo conteúdo de sacarose, características essas, importantes para o desenvolvimento da cana-energia. A presença de alelos de *S. spontaneum* concedem características desejáveis às progênes destinadas a produção de biomassa, tais como elevado número de brotações, hábito de crescimento rizomatoso, resistência ao estresse de colheita e manejo (MATSUOKA et al., 2014; DA SILVA, 2017).

Apesar de já conhecidas às características adquiridas no cruzamento entre cultivares comerciais e outras espécies, como *S. officinarum* e *S. spontaneum*, grande parte dos acessos pertencentes ao gênero *Saccharum* não foram avaliados quanto ao potencial de produção de massa seca. Além disso, existem outros gêneros pertencentes ao “complexo *Saccharum*” que apresentam potencial para serem usados no melhoramento de cana-energia através da introgressão de genes, porém, esses ainda não foram explorados (MATSUOKA et al., 2012).

Segundo Hoang et al. (2015), os indivíduos pertencentes ao gênero *Saccharum* apresentam variações genéticas entre e dentro das espécies, assim como os acessos dos gêneros *Miscanthus* e *Erianthus*, podendo ser incorporados nos programas de melhoramento de cana-de-açúcar. O cruzamento entre cultivares comerciais e acessos de *Saccharum spontaneum*, *S. robustum* e do gênero *Erianthus*, que são ricos em biomassa e apresentam elevada capacidade de perfilhamento e vigor, é uma alternativa para o melhoramento da cana-de-açúcar visando a produção de energia (CAI et al., 2005; MING et al., 2006; AITKEN; MCNEIL, 2010).

Além das características morfológicas dos acessos de *S. spontaneum*, estes vêm se destacando no desenvolvimento de cultivares de cana-energia devido a sua elevada plasticidade fenotípica e adaptação em diferentes ambientes (VALLADARES

et al., 2007). De acordo com Pigliucci, Murren e Schlichting (2006), a plasticidade fenotípica é a habilidade de um genótipo em produzir diferentes fenótipos em ambientes distintos.

Espécies poliploides, segundo Hahn, Kleunen e Schärer (2012), apresentam altos níveis de plasticidade fenotípica, sendo mais adaptadas e resistentes a fatores abióticos. Mudanças na genética, fisiologia e adaptações dessas espécies ao longo do processo evolutivo, podem aumentar e manter altos níveis de plasticidade fenotípica. Em populações naturais, como acessos exóticos, esta é uma característica altamente variável.

Caracteres genéticos e epigênicos são alterados pela ação da plasticidade fenotípica, sendo estas modificações consideradas herdáveis, ou seja, um padrão provavelmente transferido às progênes provenientes de parentais com estas características transformadas. A metilação do DNA é uma variação epigenética intimamente ligada a esta herança, sendo um processo em que a expressão gênica é controlada e modulada sem a alteração do código genético, afetando a hereditabilidade deste tipo de característica (ZHANG et al., 2013).

2.4. Avaliação da diversidade de acessos exóticos via marcadores moleculares

Segundo Ferreira e Grattapaglia (1998), todo fenótipo molecular proveniente de um gene expresso ou de fragmento específico de DNA é considerado um marcador molecular. O uso de marcadores moleculares permite estabelecer características genéticas básicas, tornando possível a avaliação da diversidade entre e dentro de espécies de forma rápida em qualquer estágio de desenvolvimento da planta, aumentando a eficiência na seleção de caracteres de interesse sem que ocorra influência ambiental (ZHANG et al., 2004; SINGH et al., 2010).

Nos programas de melhoramento clássico de cana-de-açúcar os genótipos superiores são selecionados por análises fenotípicas. Porém, neste modelo de seleção, as plantas são avaliadas em estágio de desenvolvimento avançado e os

caracteres são diretamente influenciados pelo ambiente, dificultando as avaliações e demandando muito tempo (CRESTE et al., 2008).

Atualmente, o sucesso dos programas de melhoramento das grandes culturas está diretamente relacionado com o uso de marcadores moleculares, uma vez que estes permitem a identificação de genótipos superiores resistentes a fatores abióticos, caracterização de acessos e cultivares comerciais para a realização de futuros cruzamentos, aferindo semelhança, diversidade e dissimilaridade entre estes, juntamente com as análises fenotípicas (LANZA; GUIMARÃES; SCHUSTER, 2000). Segundo Lima et al. (2002), o sucesso dos programas de melhoramento de cana-de-açúcar está associado com o conhecimento da diversidade genética dos materiais que serão utilizados nos cruzamentos.

Dentre as aplicações dos marcadores moleculares na cultura, destaca-se o acesso da diversidade genética das espécies pertencentes ao “complexo *Saccharum*”. A introgressão de genes das espécies selvagens deste complexo às cultivares modernas é uma das alternativas para ampliar a base genética da cultura, considerada estreita devido ao intenso uso de genótipos oriundos do cruzamento entre *S. officinarum* e *S. spontaneum* nos programas de melhoramento clássico (SELVI et al., 2006; AITKEN; MCNEIL, 2010).

Saccharum spontaneum apresenta indivíduos geneticamente distintos, devido à elevada ploidia e a variação de citótipos, sendo a espécie com maior variabilidade genética do gênero. O uso de marcadores moleculares permite a seleção de genótipos mais adequados, identificando alelos que controlam caracteres agrônômicos de interesse para os programas de melhoramento de cana-de-açúcar. Esta espécie tem grande importância no desenvolvimento de cana-energia, sendo correntemente utilizada como parental devido à alta produção de biomassa e plasticidade fenotípica. Além disso, o uso de marcadores moleculares permite a seleção de genes específicos para introgressão, reduzindo a inserção de genes deletérios durante os cruzamentos (DA SILVA, 2017).

Da Silva, Veremis e Solís-Gracia (2007) analisaram a variabilidade genética presente em diferentes acessos de *S. spontaneum* a partir de marcadores TRAP, selecionando indivíduos com maior quantidade de genes capazes de metabolizar a produção de açúcar. Acredita-se que muitos desses alelos ainda não tenham sido

explorados nos programas de melhoramento, sendo uma alternativa para ampliar a base genética da cultura e aumentar a produção de sacarose.

Liu et al. (2016), utilizando marcadores microssatélites na caracterização de clones de *S. spontaneum*, avaliaram a relação entre a diversidade genética e a ploidia dos mesmos. Os autores constataram que os indivíduos octaplóides e decaplóides apresentaram diversidade genética superior em relação aos demais citótipos, devido a maior troca de genes com os parentais.

Utilizando marcadores microssatélites de cloroplastos para analisarem a variação genética em diferentes espécies pertencentes ao “complexo *Saccharum*”, Raj et al. (2016) identificaram *S. spontaneum* como a espécie mais divergente geneticamente do gênero. Provavelmente, segundo os autores, esta espécie apresenta origem citoplasmática distinta em relação às demais do gênero *Saccharum*, podendo ser utilizada para diversificar a base citoplasmática das cultivares.

Além disso, fatores ambientais também podem contribuir na variabilidade dos genótipos. Fan et al. (2013), utilizando marcadores microssatélites, observaram que acessos de *S. spontaneum* provenientes de diferentes regiões da China são geneticamente distintos. Condições geográficas e ecológicas afetaram o desempenho dos mesmos, sendo a região sudoeste do país considerada a com maior diversidade da espécie.

Segundo Aitken e McNeil (2010), as cultivares de cana-de-açúcar apresentam uma alta variabilidade genética devido à elevada ploidia e a heterozigose. O uso de marcadores moleculares eficientes permite a caracterização de acessos exóticos da cultura, selecionando parentais mais apropriados para os cruzamentos, evitando a hibridação de indivíduos geneticamente semelhantes. A partir destes cruzamentos são geradas progênies com caracteres mais rústicos, como resistência a estresses ambientais, doenças, elevada produção de biomassa, alto vigor, entre outros.

A cana-de-açúcar apresenta um genoma complexo e extenso, exigindo o uso de um marcador que consiga abranger toda a amplitude do mesmo. O marcador AFLP gera um número elevado de bandas, sendo eficiente na determinação da diversidade genética entre e dentro das espécies de cana-de-açúcar (SELVI et al., 2006; AITKEN; MCNEIL, 2010). Segundo Lima et al. (2002), a técnica de AFLP

proporciona um elevado número de marcas, estabelecendo satisfatoriamente a relação genética entre diferentes clones de cana-de-açúcar.

2.5. Epigenética e metilação em plantas

As variações fenotípicas das espécies ocorrem devido a alterações genéticas e epigenéticas (JONES; SUNG, 2014). Segundo Tang e Ho (2007), a epigenética é definida como uma modificação herdável e reversível que afeta a expressão gênica sem que ocorram alterações na sequência de DNA, gerando um novo fenótipo.

As alterações epigenéticas ocorrem a partir de diferentes processos, como a ação de RNA não codificadores, modificação de histonas e a metilação de DNA (BOSSDORF et al., 2010). Essas modificações podem impedir o acesso de fatores de transcrição, limitar o acesso de proteínas e inativar as configurações da cromatina, reprimindo ou induzindo a expressão gênica (GRANT-DOWNTON; DICKINSON, 2005; D'ALESSIO; SZYF, 2006). Além disso, segundo Bednarek, Orłowska e Niedziela (2017), os padrões epigenéticos podem ser influenciados por estresses abióticos, como salinidade, frio e presença de metais pesados no solo, mostrando-se como um mecanismo de imunidade dos organismos.

O processo de metilação de DNA é desencadeado após a replicação do mesmo pela transferência de um grupo metil, proveniente de S-adenosil-metionina, ao carbono 5' da citosina situada prévia e contiguamente à uma guanina (dinucleotídeo CpG), por ação da DNA metiltransferase, alterando a conformação da cromatina (D'ALESSIO; SZYF, 2006). Segundo Bednarek, Orłowska e Niedziela (2017), em plantas a metilação da citosina irá ocorrer em sequências contendo a combinação de CG, CHG e CHH, onde H representa adenina, citosina ou timina. A combinação CG está envolvida na regulação de expressão gênica e as demais na regulação de atividade de transposons pela remodelação da cromatina.

De acordo com Kalisz e Purugganan (2004), os epialelos diferem pelo número de nucleotídeos metilados em um gene específico, sendo que diferentes locais de metilação podem gerar genótipos distintos. A epimutabilidade natural ocorre pelo

ganho ou perda de metilação no DNA, normalmente em elementos transponíveis ou em sequências repetitivas localizadas próximas ou juntamente ao gene afetado (WEIGEL; COLOT, 2012).

Luo et al., (1996) reportaram a primeira alteração epialélica natural em *Linaria vulgaris*, uma planta ornamental em que as flores, normalmente com simetria bilateral, apresentavam simetria radial. Isolando o gene homólogo à *cycloidea* (*cyc*), um dos responsáveis pela simetria floral, perceberam que este permanecia intacto. Porém, ao analisarem o mesmo utilizando enzimas de restrição sensíveis a metilação do DNA, identificaram um aumento na metilação dos loci de *cyc*. A expressão de *cyc* foi reduzida com o aumento da metilação do DNA, gerando um novo fenótipo.

Plantas poliploides apresentam um genoma plástico, com mecanismos capazes de regular o desenvolvimento das mesmas e mediar mudanças deletérias. Essa capacidade está diretamente relacionada com a resposta das plantas às mudanças epigenéticas, promovendo adaptações a estímulos e estresses ambientais. A redundância genômica e as interações genéticas das espécies poliploides induzem mudanças genéticas e epigenéticas, permitindo o estabelecimento de novos fenótipos e adaptação em diferentes ambientes (SONG; CHEN, 2015).

Segundo Bossdorf et al. (2010), as alterações epigenéticas, independente da variação genética, podem gerar maior variabilidade fenotípica em plantas poliploides, devido a capacidade de regulação da expressão gênica e silenciamento de genes duplicados, e alterar a plasticidade fenotípica. Keyte et al. (2006), avaliando a metilação de DNA em acessos de algodão (*Gossypium hirsutum*) observaram que os níveis de variação epigenética foram superiores aos de variação genética. Além disso, de acordo com Suo, Dong e Kang (2015), os processos de hibridização e poliploidização promovem alterações nas taxas de metilação do DNA, atuando como um mecanismo de regulação das plantas.

As mudanças epigenéticas em plantas são padrões herdáveis, sendo transmitidas através das gerações às progênes, produzindo novos fenótipos (LI et al., 2008). Essas alterações estão diretamente relacionadas com a evolução das plantas, uma vez que os diferentes fenótipos gerados irão apresentar níveis distintos de adaptação ao ambiente (HERRERA; BAZAGA, 2010). A caracterização dos acessos

exóticos das espécies quanto ao padrão de metilação de DNA é uma das formas de estimar a contribuição da variação epigenética à evolução genômica.

2.6. Técnica de MSAP

A metilação de DNA, um dos processos responsáveis por alterações epigenéticas em diferentes organismos, é capaz de modular e controlar a expressão gênica nestes (SCHULZ; ECKSTEIN; DURKA, 2013). Existem diferentes métodos para a caracterização de genoma ao nível de metilação de organismos modelo, como as técnicas de microarranjo (BOCK, 2012) e sequenciamento de nova geração de DNA convertido com bissulfito (FUJIMOTO et al., 2012). Porém, estes métodos apresentam custo elevado, inviabilizando o estudo ao nível populacional e de genomas mais complexos.

A técnica de MSAP (*Methylation sensitive amplification polymorphism*) é uma modificação da técnica de AFLP (*Amplified fragment length polymorphism*) (VOS et al., 1995), que permite a caracterização epigenética dos organismos através do uso das isoenzimas *HpaII* e *MspI*. Estas enzimas diferem quanto à sensibilidade à metilação, clivando regiões distintas do genoma e permitindo a comparação de sítios metilados (SCHULZ; ECKSTEIN; DURKA, 2013).

A técnica consiste no uso da enzima de corte raro *EcoRI* juntamente com enzimas de restrição sensíveis à metilação (*HpaII* e *MspI*) que são capazes de reconhecer e clivar o tetranucleotídeo 5'CCGG em locais distintos. Ambas as enzimas irão cortar a sequência quando nenhuma citosina estiver metilada, porém *HpaII* irá cortar sequências semi-metiladas na citosina externa, enquanto *MspI* cortará sequências em que as citosinas internas estiverem semi ou completamente metiladas. Em sequências com metilação completa da citosina externa, com metilação parcial e completa de ambas as citosinas (internas e externas) e em que ocorra mutação, nenhuma das enzimas irá realizar o corte. Os fragmentos gerados a partir dos cortes realizados pelas enzimas são agrupados de acordo com a classe em que os seus

sítios de restrição se encaixam (Figura 1). Essas enzimas irão reconhecer sequências metiladas em combinações CG e CHG (SCHULZ; ECKSTEIN; DURKA, 2013).

	Status de metilação	HpaII	MspI	Padrão de metilação								
<table border="1"><tr><td>C</td><td>C</td><td>G</td><td>G</td></tr><tr><td>G</td><td>G</td><td>C</td><td>C</td></tr></table>	C	C	G	G	G	G	C	C	Sem metilação	+	+	I
C	C	G	G									
G	G	C	C									
<table border="1"><tr><td>C</td><td>C</td><td>G</td><td>G</td></tr><tr><td>G</td><td>G</td><td>C</td><td>C</td></tr></table>	C	C	G	G	G	G	C	C	Metilação completa da citosina interna	-	+	II
C	C	G	G									
G	G	C	C									
<table border="1"><tr><td>C</td><td>C</td><td>G</td><td>G</td></tr><tr><td>G</td><td>G</td><td>C</td><td>C</td></tr></table>	C	C	G	G	G	G	C	C	Semi-metilação da citosina interna	-	+	II
C	C	G	G									
G	G	C	C									
<table border="1"><tr><td>C</td><td>C</td><td>G</td><td>G</td></tr><tr><td>G</td><td>G</td><td>C</td><td>C</td></tr></table>	C	C	G	G	G	G	C	C	Semi-metilação da citosina externa	+	-	III
C	C	G	G									
G	G	C	C									
<table border="1"><tr><td>C</td><td>C</td><td>G</td><td>G</td></tr><tr><td>G</td><td>G</td><td>C</td><td>C</td></tr></table>	C	C	G	G	G	G	C	C	Metilação completa da citosina externa	-	-	IV
C	C	G	G									
G	G	C	C									
<table border="1"><tr><td>C</td><td>C</td><td>G</td><td>G</td></tr><tr><td>G</td><td>G</td><td>C</td><td>C</td></tr></table>	C	C	G	G	G	G	C	C	Metilação completa de ambas citosinas	-	-	IV
C	C	G	G									
G	G	C	C									
<table border="1"><tr><td>C</td><td>C</td><td>G</td><td>G</td></tr><tr><td>G</td><td>G</td><td>C</td><td>C</td></tr></table>	C	C	G	G	G	G	C	C	Semi-metilação de ambas citosinas	-	-	IV
C	C	G	G									
G	G	C	C									
<table border="1"><tr><td>MUTAÇÃO</td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td></td><td></td><td></td><td></td></tr></table>	MUTAÇÃO								Padrão desconhecido	-	-	IV
MUTAÇÃO												

Figura 1 – Sensibilidade das enzimas *HpaII* e *MspI* aos diferentes tipos de metilação do tetranucleotídeo 5' CCGG. Os padrões de metilação representam: I) Não metilado - fragmentos presentes em ambos os perfis; II) Fragmentos presente no perfil contendo *EcoRI/ MspI*; III) Fragmentos presente no perfil contendo *EcoRI/ HpaII*; IV) Ausência de fragmentos em ambos os perfis. ('+' – corte enzimático, '-' – ausência de corte). Citosinas metiladas indicadas pela cor vermelha. Adaptado de Schulz, Eckstein e Durka (2013).

Segundo Alonso et al. (2016), a técnica de MSAP pode ser aplicada à organismos sem um genoma de referência previamente sequenciado e é extremamente útil para acessar a metilação de citosina em loci desconhecidos distribuídos aleatoriamente no genoma.

Schulz, Eckstein e Durka (2014), analisando populações de *Viola elatior* provenientes de ambientes distintos e submetidas a diferentes níveis de luminosidade, estimaram a diversidade genética e epigenética dos genótipos, através das técnicas de AFLP e MSAP, respectivamente. Tanto dentro quanto entre as populações de *V. elatior* os níveis de diversidade genética foram baixos, enquanto que os níveis de diversidade epigenética, em quase todas as populações, foram superiores à primeira. Segundo os autores, a diversidade epigenética é mais

proeminente do que a diversidade genética em ambientes distintos, sendo relacionada com a adaptação de genótipos aos fatores abióticos.

Além disso, esta técnica tem sido utilizada para acessar a variabilidade da metilação de DNA e a estrutura epigenética de acessos selvagens de diferentes plantas, relacionar as condições ambientais a caracteres fenotípicos e metilação de loci (ALONSO et al., 2016). Li et al. (2008) utilizaram a técnica de MSAP para identificar diferenças nos padrões de metilação de DNA entre e dentro de populações distintas de *Hordeum brevisubulatum*, uma espécie de cevada perene selvagem, sendo esta poliploide. Entre e dentro das populações foram identificados diferentes padrões de metilação, estabelecendo esta técnica como uma ferramenta eficiente na avaliação da estrutura epigenética de populações selvagens.

Modificações nos padrões de metilação de DNA estão diretamente relacionadas com a variação somaclonal em plantas. Francischini et al. (2017) exploraram a ocorrência de mudanças nos padrões de metilação utilizando a técnica de MSAP em plântulas de cana-de-açúcar micropropagadas, comparando-as com as plantas matrizes. A maioria dos polimorfismos identificados entre as plantas mãe e as plântulas micropropagadas derivaram do uso de enzimas *EcoRI/MspI*, sugerindo alterações devido ao ganho ou perda de metilação nas citosinas internas. Esta técnica se mostrou vantajosa para acessar a fidelidade de plântulas micropropagadas em relação às plantas matrizes de cana-de-açúcar.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Genótipos

Os acessos estudados foram provenientes do Banco de Germoplasma do Programa de Melhoramento Genético de Cana-de-Açúcar do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), Centro de Cana, em Ribeirão Preto, São Paulo. A diversidade genética foi explorada em um conjunto de 60 acessos, incluindo 10 cultivares comerciais, 5 acessos de *Saccharum robustum*, 4 acessos de *S. barberi*, 24 acessos de *S. spontaneum*, 12 acessos de *S. officinarum* e 5 acessos *Erianthus* sp. (Tabela 1).

Tabela 1 – Descrição dos 60 acessos investigados através da técnica de MSAP.

Acessos	Espécie	Origem	Acessos	Espécie	Origem
IACSP91-1099	<i>Saccharum</i> sp.	Brasil	IS76125	<i>S. spontaneum</i>	Indonésia ²
IACSP93-3046	<i>Saccharum</i> sp.	Brasil	IS76173	<i>S. spontaneum</i>	Indonésia ²
IACSP95-5000	<i>Saccharum</i> sp.	Brasil	PIN84-001	<i>S. spontaneum</i>	
IACSP94-4004	<i>Saccharum</i> sp.	Brasil	US4633	<i>S. spontaneum</i>	Quênia ²
IACSP96-3076	<i>Saccharum</i> sp.	Brasil	US78-519	<i>S. spontaneum</i>	Paquistão ²
RB855465	<i>Saccharum</i> sp.	Brasil	US78-523	<i>S. spontaneum</i>	Paquistão ²
RB867515	<i>Saccharum</i> sp.	Brasil	US78-518	<i>S. spontaneum</i>	Paquistão ²
RB855156	<i>Saccharum</i> sp.	Brasil	SES103	<i>S. spontaneum</i>	Índia ²
SP80-3280	<i>Saccharum</i> sp.	Brasil	UM69-015	<i>S. spontaneum</i>	Malásia ²
CTC4	<i>Saccharum</i> sp.	Brasil	THA83-171	<i>S. spontaneum</i>	Tailândia ²
US5714105	<i>S. robustum</i>	Nova Guiné ¹	Taiwan spont. 072	<i>S. spontaneum</i>	Taiwan ²
IJ76293	<i>S. robustum</i>		Taiwan spont. 064	<i>S. spontaneum</i>	Taiwan ²
IM76229	<i>S. robustum</i>		GLAGAH	<i>S. spontaneum</i>	Java, Indonésia ²
57NG2	<i>S. robustum</i>	Nova Guiné ¹	BADILA	<i>S. officinarum</i>	Nova Guiné ³
IM 76-232	<i>S. robustum</i>	Nova Guiné ¹	MUNTOK JAVA	<i>S. officinarum</i>	Java, Indonésia ³
MATNA SHAHJ	<i>S. barberi</i>	Índia ¹	SABURA	<i>S. officinarum</i>	
CHIN	<i>S. barberi</i>	Índia ¹	LOUISIANA STRIPED	<i>S. officinarum</i>	
GANDA CHENI	<i>S. barberi</i>	Índia ⁴	NG271124	<i>S. officinarum</i>	Nova Guiné ³
Chunnee	<i>S. barberi</i>	Índia ⁴	IJ76-470	<i>S. officinarum</i>	
Coimbatore	<i>S. spontaneum</i>	Índia ²	S. OFFICINARUM 8272	<i>S. officinarum</i>	
US851008	<i>S. spontaneum</i>	Vietnã ²	IJ76-315	<i>S. officinarum</i>	
Djantoe II (2)	<i>S. spontaneum</i>	Indonésia ²	IJ76-319	<i>S. officinarum</i>	
Gehra-Bom	<i>S. spontaneum</i>	Java, Indonésia ²	IN84-5	<i>S. officinarum</i>	Indonésia ³
Gugu	<i>S. spontaneum</i>	China ²	IJ76-442	<i>S. officinarum</i>	
Holes 1	<i>S. spontaneum</i>	Nova Guiné ²	KHAJURIA	<i>S. officinarum</i>	
S. spont #28	<i>S. spontaneum</i>	Taiwan ¹	IJ76-384	<i>Erianthus</i> sp.	Indonésia ²
SES033	<i>S. spontaneum</i>	Índia ²	IJ76-358	<i>Erianthus</i> sp.	Indonésia ²
SES084	<i>S. spontaneum</i>	Índia ²	IJ76-381	<i>Erianthus</i> sp.	
SES234	<i>S. spontaneum</i>	Índia ²	IJ76-364	<i>Erianthus</i> sp.	Indonésia ²
SES323	<i>S. spontaneum</i>	Índia ²	IJ76-359	<i>Erianthus</i> sp.	Indonésia ²

¹Brown et al., 2007; ²Australian Government, 2010; ³Aitken et al., 2006; ⁴Artschwager, 1954.

Os acessos que compõe o germoplasma básico da cana-de-açúcar são provenientes do banco de germoplasma de Miami e foram mantidos no jardim clonal do Centro de Cana, após o período de quarentena, nas mesmas condições

ambientais, assim como as cultivares comerciais, porém estas apresentam idades distintas.

3.2. Extração de DNA

Foram coletadas folhas sadias dos 60 acessos de cana-de-açúcar, sendo essas maceradas em triturador (Tissuelyser, Quiagen). A extração de DNA total genômico foi realizada utilizando kit de extração Sigma (GenElute Plant Genomic DNA, Miniprep Kit), seguida de quantificação dos indivíduos em gel de agarose (0,8%) corado com brometo de etídio na presença de uma amostra padrão (DNA do fago λ) e visualização em transluminador de luz ultravioleta. Após quantificação, os acessos foram diluídos a concentração de 10 ng/ μ L.

3.3. Técnica de MSAP

Digestão do DNA com endonucleases de restrição

Os marcadores do tipo MSAP foram obtidos com base na técnica de AFLP (*Amplified fragment length polymorphism*) descrita por Vos et al. (1995), porém com a utilização de enzimas sensíveis à metilação, segundo o protocolo descrito por Lei et al. (2006). Este protocolo foi ajustado em termos das concentrações dos primers seletivos para a revelação no analisador de DNA 4300 da LiCor.

Foram realizadas duas reações de digestão dupla do DNA genômico, separadamente, utilizando a enzima de restrição de corte raro *EcoRI* (Invitrogen) em combinação com as enzimas de restrição sensíveis à metilação, *HpaII* e *MspI* (Fermentas). Utilizou-se 250 nanogramas de DNA genômico para a digestão em uma reação de volume final de 20 μ L contendo as enzimas *EcoRI* e *HpaII* (primeira

situação) e *EcoRI* e *MspI* (segunda situação), ambas a concentração de 2.5U em tampão One Phor All (OPA) no termociclador (BioRad, MyCycler) à temperatura de 37 °C por 4 horas, seguida de 15 minutos à 65 °C para inativação enzimática.

Ligação dos adaptadores e pré-amplificação

As ligações das sequências adaptadoras às extremidades clivadas pelas enzimas foram conduzidas em um volume final de reação de 40 uL em tampão 5X, contendo 20 uL da reação de digestão, 33,5 U/uL T4 DNA ligase (BioLabs), 0,5 mM de ATP, 4 uM do adaptador *EcoRI* (5 moles) e 40 uM do adaptador *HpaII/ MspI*. As amostras foram incubadas em termociclador por 15 horas a 37 °C. As sequências dos adaptadores bem como dos primers pré-seletivos e seletivos estão descritas na Tabela 2.

Tabela 2 - Sequências (5'-3') de adaptadores, primers pré – seletivos e seletivos utilizados na técnica de MSAP*.

Tipo	Nome	Enzima	Marcação Infravermelha	Sequência (5'-3')
Adaptadores	<i>Eco</i> A+	<i>EcoRI</i>	-	CTCGTAGACTGCGTACC
	<i>Eco</i> A-	<i>EcoRI</i>	-	AATTGGTACGCAGTCTAC
	<i>HpaI/ Msp</i> A+	<i>HpaII/Mspl</i>	-	GACGATGAGTCCTGAT
	<i>HpaI/ Msp</i> A-	<i>HpaII/Mspl</i>	-	CGATCAGGACTCAT
Primers pré-seletivos	<i>Eco</i> ⁺⁰	<i>EcoRI</i>	-	GACTGCGTACCAATTC
	<i>HpaII</i> ⁺⁰ / <i>MspI</i> ⁺⁰	<i>HpaII/Mspl</i>	-	GATGAGTCC TGAGTAA
Primers seletivos	E1	<i>EcoRI</i>	700	CTGCGTACCAATTCaac
	E2	<i>EcoRI</i>	700	CTGCGTACCAATTCaca
	E3	<i>EcoRI</i>	700	CTGCGTACCAATTCacc
	E4	<i>EcoRI</i>	800	CTGCGTACCAATTCaga
	E5	<i>EcoRI</i>	800	CTGCGTACCAATTCagg
	MH1	<i>HpaII/Mspl</i>	-	GATGAGTCCTGATCGGaca
	MH2	<i>HpaII/Mspl</i>	-	GATGAGTCCTGATCGGacc
	MH3	<i>HpaII/Mspl</i>	-	GATGAGTCCTGATCGGact
	MH4	<i>HpaII/Mspl</i>	-	GATGAGTCCTGATCGGcgc
	MH5	<i>HpaII/Mspl</i>	-	GATGAGTCCTGATCGGgac
	MH6	<i>HpaII/Mspl</i>	-	GATGAGTCCTGATCGGtcg
	MH7	<i>HpaII/Mspl</i>	-	GATGAGTCCTGATCGGttg

* Fonte: Lei et al., 2006.

Após a ligação dos adaptadores, uma alíquota de 5 uL da reação foi diluída 6 vezes (6X) em água milli-Q. Foram utilizados dois microlitros desta diluição na reação de pré-amplificação, conduzida em um volume final de 15 uL contendo tampão 10X (200 mM Tris pH 8.4, 500 mM KCl), 0,5 mM MgCl₂, 0,16 mM dNTPs, 3,3 uM do primer pré - seletivo *Eco*⁺, 3,3 uM do primer pré – seletivo *Hpa*II⁺/*Msp*I⁺ e 0,1U de Taq DNA polimerase.

As reações de PCR foram conduzidas em termociclador a 94 °C por 30 segundos, seguidas de uma temperatura de anelamento a 56 °C por 60 segundos e extensão a 72 °C por 60 segundos, em um total de 29 ciclos.

Amplificação e combinação seletiva MSAP

Os primers *Eco* apresentam marcações com sondas infravermelhas, permitindo a distinção de comprimentos de onda de 700 ou 800 nm para leitura no analisador de DNA 4300 da LiCor. As melhores combinações seletivas (*Eco*RI/*Hpa*II e *Eco*RI/*Msp*I) foram selecionadas e avaliadas em relação a quantidade de polimorfismos e padrões de metilação (Tabela 3).

Tabela 3 – Combinações seletivas utilizadas.

Identificação	Primer <i>Eco</i> RI	Primer <i>Hpa</i> II/ <i>Msp</i> I
1	CTGCGTACCAATTC ACA	GATGAGTCCTGATCGG TTG
2	CTGCGTACCAATTC AGA	GATGAGTCCTGATCGG ACC
3	CTGCGTACCAATTC ACA	GATGAGTCCTGATCGG ACT
4	CTGCGTACCAATTC AGG	GATGAGTCCTGATCGG TTG
5	CTGCGTACCAATTC ACA	GATGAGTCCTGATCGG ACC
6	CTGCGTACCAATTC AGA	GATGAGTCCTGATCGG ACT
7	CTGCGTACCAATTC ACA	GATGAGTCCTGATCGG TGG
8	CTGCGTACCAATTC AGA	GATGAGTCCTGATCGG TTG
9	CTGCGTACCAATTC ACC	GATGAGTCCTGATCGG GAC
10	CTGCGTACCAATTC ACC	GATGAGTCCTGATCGG TTG
11	CTGCGTACCAATTC AGG	GATGAGTCCTGATCGG ACC
12	CTGCGTACCAATTC ACC	GATGAGTCCTGATCGG ACA
13	CTGCGTACCAATTC AGG	GATGAGTCCTGATCGG CGC
14	CTGCGTACCAATTC ACC	GATGAGTCCTGATCGG TTG
15	CTGCGTACCAATTC AGG	GATGAGTCCTGATCGG ACT

Os produtos amplificados na reação de pré-amplificação foram diluídos 10 vezes (10X) em água milli-Q. A amplificação seletiva foi conduzida em um volume final de 10 µL contendo tampão 10X (200 mM Tris pH 8.4, 500 mM KCl), 0,25 mM de dNTPs, 2,0 mM de MgCl₂, 1,3 µM do primer seletivo *EcoRI* e 1,3 µM do primer seletivo *HpaII* ou *MspI* e 0,2 U de Taq DNA polimerase e 2,5 µL da diluição 10X da reação de pré-amplificação.

As reações foram amplificadas em termociclador utilizando: um ciclo a 94 °C por 30 segundos, 65 °C por 30 segundos e 72 °C por 60 segundos, 12 ciclos a 94 °C por 30 segundos, 65 °C, reduzindo 0,7 °C em cada ciclo, por 30 segundos e 72 °C por 60 segundos, e 23 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 56 °C por 30 segundos e 72 °C por 60 segundos, resfriando a 4 °C, sendo posteriormente armazenadas em -20 °C.

Os produtos das ampliações de duas combinações seletivas com marcações infravermelhos distintas foram misturados (*EcoRI* (700)/ *HpaII/MspI* e *EcoRI* (800)/ *HpaII/ MspI*) juntamente com tampão formamida 6X (LiCor, Bioscience), diluindo esta reação cinco vezes com água milli-Q. As amostras foram desnaturadas a 95 °C por 5 minutos e, em seguida, a microplaca contendo as mesma foi transferida para o gelo. Como padrão de peso molecular utilizou-se o ladder de 50 bp, desnaturado juntamente com as amostras. As amostras foram separadas em gel de poliacrilamida desnaturante a 5% em genotipador de DNA (Infrared 4300 DNA Analyzer, LiCor Bioscience), juntamente com o ladder.

Genotipagem e estabelecimento dos perfis moleculares

A análise molecular dos dados gerados foi realizada utilizando o programa Saga™ (Automated AFLP Analysis Software) da LiCor Biosciences. A partir das imagens geradas pelo genotipador de DNA, utilizando o ladder como referencial, foi determinado o tamanho de cada locus do gel.

Os genótipos foram avaliados quanto à presença e ausência de bandas por comparações lado a lado dos perfis moleculares obtidos pelas combinações de enzimas *EcoRI/HpaII* e *EcoRI/MspI*. As bandas produzidas pelos marcadores foram

convertidas em uma matriz binária, onde a presença de bandas foi substituída por “1” e a ausência por “0”. Quatro padrões foram observados: ausência de metilação (1/1), metilação completa ou semi-metilação da citosina interna (0/1), semi-metilação da citosina externa (1/0), não informativo ou ausência de sítio de restrição (0/0).

3.4. Análise de dados

A partir da matriz binária obtida, os loci foram classificados como suscetíveis à metilação (*Methylation-susceptible loci* – MSL) e não metilados (*Non-methylated loci* – NML), sendo que o primeiro engloba três padrões (-/+, +/-, -/-) e o segundo é referente apenas ao padrão de ausência de metilação (+/+), através do programa R, pacote R MSAP (PÉREZ-FIGUEROA, 2013), versão 3.2.5 (R Core Team, 2014). Além disso, foi estimado o número de loci polimórficos de cada combinação, assim como o índice médio de diversidade de Shannon dos MSL e NML polimórficos obtidos por este pacote.

Os quatro padrões de metilação foram estimados para os grupos de cultivares comerciais, *Saccharum robustum*, *S. barberi*, *S. spontaneum*, *S. officinarum* e *Erianthus*. Os níveis de metilação completa ou semi-metilação da citosina interna e metilação da citosina externa foram estimados considerando cada combinação seletiva de primer (*EcoRI*/*HpaII* - *MspI*) utilizada. Os intervalos de confiança para estas estimativas foram calculados através do programa VassarStats (plataforma VassarStats, <http://vassarstats.net/prop1.html>), considerando 95% de probabilidade estatística.

A matriz de dados obtida através da genotipagem foi transformada em outra matriz, como proposto por Ma et al. (2013), denominada de matriz de polimorfismos sensíveis a metilação (*Methylation-sensitive polymorphism* – MSP), sendo uma matriz binária em que a presença de metilação (metilação completa ou semi-metilação da citosina interna e metilação da citosina externa) foi considerada “1” e a ausência de metilação e dados não informativos foi tida como “0”. As demais análises foram realizadas utilizando essa matriz.

O conteúdo de informação de polimorfismo (*Polymorphism information content* – PIC) foi calculado para cada combinação de primer. Considerando apenas duas frequências de combinação (presença – 1 e ausência de metilação – 0), o valor de PIC foi dado segundo a expressão:

$$PIC = 1 - \sum p_i^2,$$

onde p_i é a frequência do alelo p no i -ésimo locus.

A análise da estrutura genética foi realizada através do agrupamento bayesiano dos dados no programa STRUCTURE (PRITCHARD; STEPHENS; DONNELLY, 2000) versão 2.3.4. (PRITCHARD; WEN; FALUSH, 2010).

Para execução do programa, os acessos foram considerados haploides, sendo agrupados no modelo *admixture*, no qual se considera que os indivíduos apresentam ancestralidade mista, podendo um acesso ser agrupado em um grupo distinto daquele anteriormente classificado. Avaliou-se a hipótese de K (número de subpopulações) variando de 1 a 10, sendo o agrupamento mais provável obtido a partir de 100000 interações iniciais (período de *burnin*) e 200000 interações de MCMC (*Monte Carlo Markov Chain*). A veracidade dos resultados obtidos foi verificada pela execução do programa por 10 vezes para cada hipótese K. Os resultados de todas as corridas foram avaliados através do programa STRUCTURE HARVESTER v.0.6.94 (EARL; VONHOLDT, 2012), determinando o número mais provável de K, segundo o método proposto por Evanno, Regnaut e Goudet (2005).

A análise de variância molecular (AMOVA) foi realizada no programa Arlequin v.3.5 (EXCOFFIER; LISCHER, 2010) baseada em marcadores polimórficos sensíveis à metilação, testando a variabilidade dentro e entre grupos. Nesta análise foi considerado o número de subpopulações (K) obtido através do programa STRUCTURE, uma vez que este valor de K permite a organização dos acessos quanto à subpopulação em que estes possivelmente se agruparam.

A matriz de dissimilaridade genética foi calculada pelo programa Darwin v.6 (PERRIER; JACQUEMOUD-COLLET, 2006) utilizando o coeficiente de Jaccard, dado pela seguinte fórmula:

$$J(i^1, i^2) = a / (a+b+c),$$

onde a é o número de fragmentos que compartilhados nos acessos i^1 e i^2 , b indica o número de fragmentos presente em i^1 e ausentes em i^2 e c o número de fragmentos presente em i^2 e ausente em i^1 , segundo Schönswetter et al., (2003).

As relações de dissimilaridade entre os acessos foram visualizadas através da construção de um dendrograma no mesmo programa utilizando o método de *Neighbor-joining* (SAITOU; NEI, 1987) entre os loci polimórficos considerados como suscetíveis a metilação e os não suscetíveis à metilação. Para comprovar a consistência da topologia formada, optou-se pela utilização do método de *bootstrap* com 1000 repetições.

4. RESULTADOS

4.1. Análise de polimorfismos MSAP

Quatro padrões de metilação foram observados nos perfis moleculares gerados utilizando a técnica de MSAP, a partir dos quais foram elaboradas matrizes binárias, onde a presença de marcas (+) foram consideradas “1” e ausência de marcas (–) “0”, como visto na Figura 2.

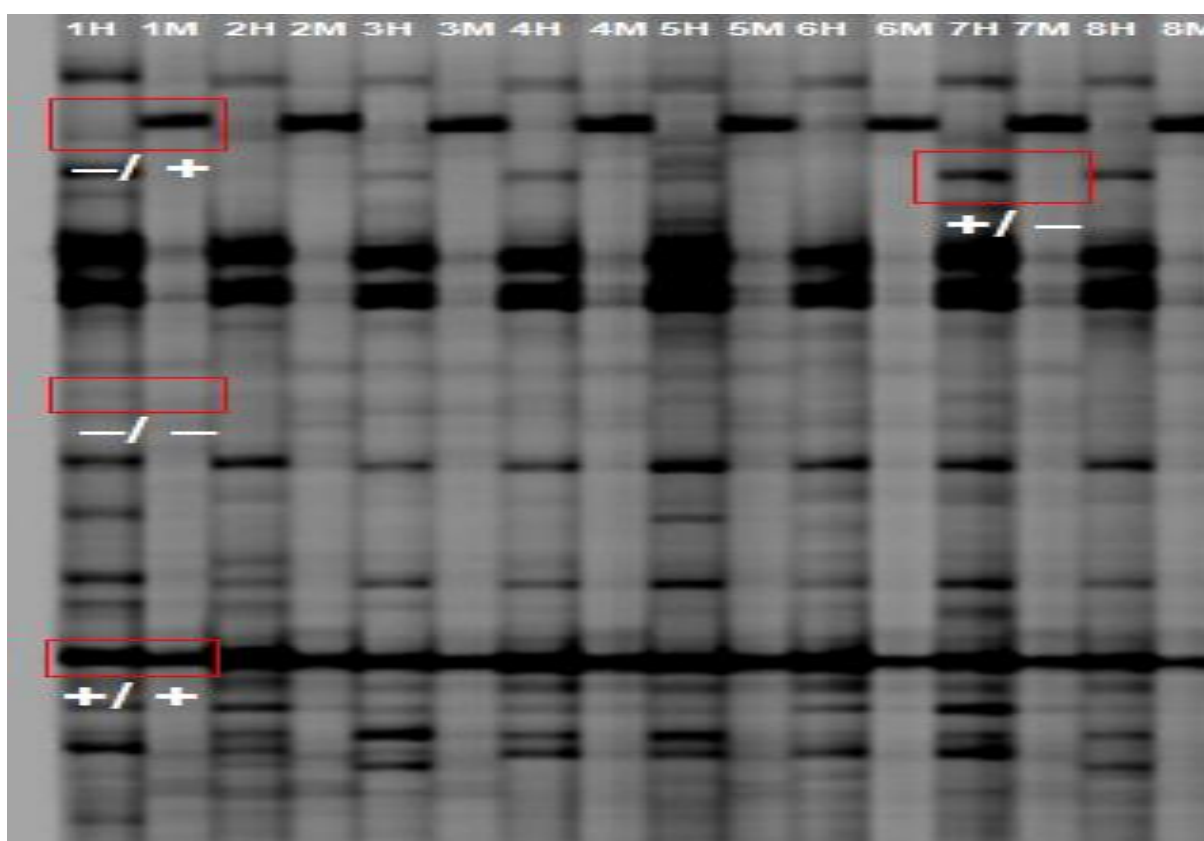


Figura 2 – Perfil molecular gerado através da técnica de MSAP em gel de poliacrilamida desnaturante (5%) no analisador de DNA 4300 da LiCor, indicando os quatro padrões possivelmente observados: ausência de metilação (+/+), metilação completa ou semi metilação da citosina interna (-/+), semi metilação da citosina externa (+/-), não informativo (-/-). Os números acima seguidos pelas letras “H” e “M” indicam a amostra e a enzima de corte frequente utilizada juntamente com a enzima de corte raro, *EcoRI* (H- *HpaII* e M- *MspI*).

As 15 combinações seletivas de primers geraram 1341 loci (marcas), variando de 37 a 479 bp, dentre os quais 1117 (83,30%) foram considerados loci suscetíveis a metilação (*Methylation-susceptible loci* – MSL) e 224 (16,70%) loci não metilados (*Non-methylated loci* – NML). O número de loci variou de 69 a 104 utilizando as combinações 8 e 12, respectivamente (Tabela 4).

Tabela 4 – Número de loci e polimorfismos gerados utilizando 15 combinações de primers seletivos *EcoRI/HpaII* e *EcoRI/MspI* (H/M). MSL (*Methylation-susceptible loci*) - loci suscetíveis a metilação, NML (*Non-methylated loci*) - loci não metilados, PIC (*Polymorphism Information Content*) – Conteúdo de informação de polimorfismo.

Combinações de primers seletivos	Nº loci	MSL	Polimorfismos MSL*	NML	Polimorfismos NML*	Tamanho dos fragmentos (bp)	PIC
1) E(ACA)/ H/M(TTG)	74	65	65	9	7	402 - 67	0.321
2) E(AGA)/ H/M(ACC)	91	63	62	28	27	442 -37	0.252
3) E(ACA)/ H/M(ACT)	81	71	71	10	2	388 -49	0.334
4) E(AGG)/ H/M(TTG)	76	61	61	15	11	478-49	0.293
5) E(ACA)/ H/M(ACC)	102	90	90	12	9	412-51	0.327
6)E(AGA)/ H/M(ACT)	83	67	67	16	12	437-45	0.316
7) E(ACA)/ H/M(TCG)	92	76	76	16	11	313-53	0.311
8) E(AGA)/ H/M(TTG)	69	62	60	7	3	358-51	0.370
9) E(ACC)/ H/M(GAC)	84	78	78	6	4	389-76	0.350
10) E(ACC)/ H/M(TTG)	100	93	84	7	4	466-50	0.394
11) E(AGG)/ H/M(ACC)	93	87	87	6	5	387-64	0.329
12) E(ACC)/ H/M(ACA)	104	74	72	30	29	409-63	0.262
13) E(AGG)/ H/M(CGC)	94	76	76	18	17	368-58	0.282
14) E(ACC)/ H/M(TTG)	96	82	82	14	13	367-61	0.334
15) E(AGG)/ H/M(ACT)	102	72	69	30	23	378-59	0.275
Média	89,4	74,4	73,3	14,9	7,3	-	0,317
Total	1341	1117	1100 ¹	224	177 ²	-	-

*Índice de diversidade de Shannon: ⁽¹⁾ 0,578 ± 0,121; ⁽²⁾ 0,397 ± 0,194, segundo o teste de soma de postos de Wilcoxon com correção de continuidade (149268.5, p < 0.0001).

Dentre os MSL, 98% (1100 loci) foram considerados polimórficos, com diversidade média de 0,578 ± 0,121, segundo o índice de diversidade de Shannon. As combinações de primers 1, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 11, 13, e 14 apresentaram 100% dos loci como sendo polimórficos. A combinação 10 apresentou o maior número de loci nesta condição, porém apenas 90,30% dos loci (84) foram considerados polimórficos.

A porcentagem polimorfismos nos NML foi de 79% (177), com diversidade média de 0,397 ± 0,194. A combinação 12 apresentou 97% de loci polimórficos (29), enquanto que na combinação 3 apenas 20% dos loci (2) apresentaram polimorfismos (Tabela 3).

O conteúdo de informação de polimorfismo (PIC) variou de 0,252 (combinação 2) a 0,394 (combinação 10), com média de 0,317. A combinação 8, mesmo com o menor número de loci, apresentou o segundo maior valor de PIC (0,370), como visto na Tabela 4.

4.2. Avaliação dos níveis de metilação entre grupos de acessos

Os níveis de loci não metilados foram superiores aos demais padrões de metilação em cinco grupos de acessos. O grupo das cultivares comerciais apresentou a maior porcentagem de loci considerados como não informativos ou sem sítio de restrição, considerando as 15 combinações de primers seletivos utilizadas, porém esta condição não foi significativa em um intervalo de confiança a 95% de probabilidade. Entretanto, este mesmo grupo apresentou a menor frequência de ausência de metilação dentre os grupos analisados, sendo esta significativa (Figura 3, Tabela 5).

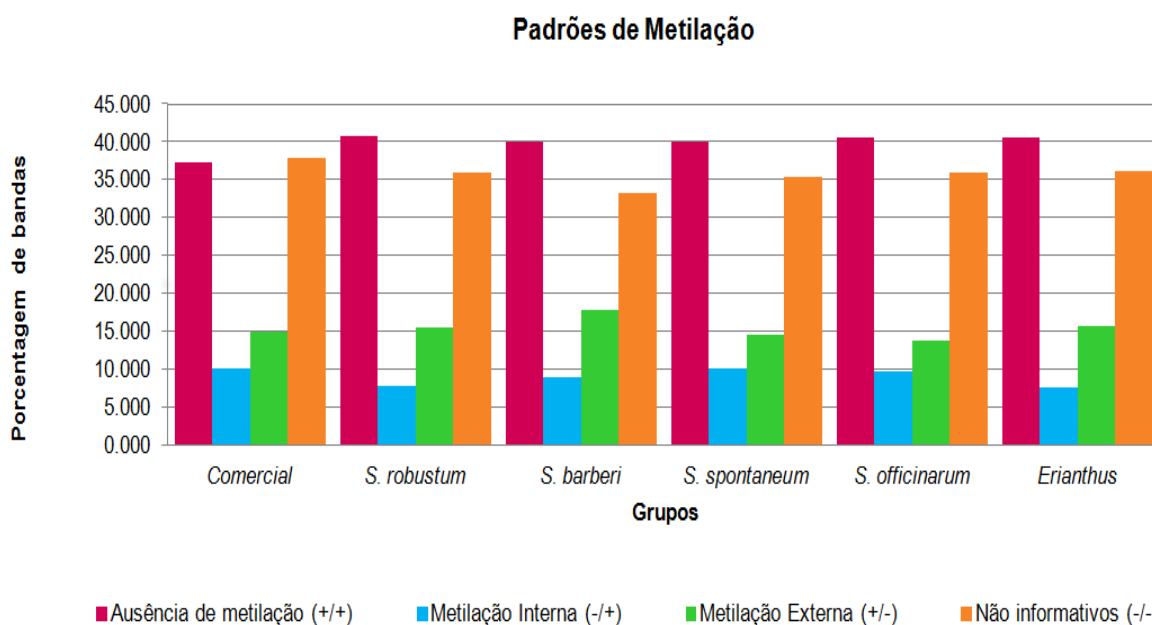


Figura 3 – Porcentagem dos padrões de metilação obtidos nos seis grupos de acessos de cana-de-açúcar.

Saccharum robustum apresentou a maior frequência de loci não metilados (40,686%; IC 95%: 39,52 a 41,87%), enquanto que as cultivares comerciais evidenciaram apenas 37,293% dos loci como sendo deste padrão (IC 95%: 36,48 a 38,10%). Considerando o padrão de metilação interna, *S. spontaneum* apresentou o maior número de loci nessa condição (10,052%; IC 95%: 9,73 a 10,38%), enquanto que *Erianthus* o menor número de marcações (7,636%; IC 95%: 7,03 a 8,30%). No padrão de metilação externa, *S. barberi* apresentou o maior número de loci (17,729%; IC 95%: 16,73 a 18,78%) e *S. officinarum* o menor (13,777%; IC 95%: 13,26 a 14,32%), como visto na Figura 3 e na Tabela 5.

Tabela 5 – Porcentagem de metilação observada nos seis grupos de acessos de cana-de-açúcar.

Padrões	Ausência de metilação (+/+)			Metilação citosina interna (-/ +)			Semi-metilação externa (-/+)			Não informativo (-/-)		
	nº bandas	%	IC*	nº bandas	%	IC*	nº bandas	%	IC*	nº bandas	%	IC*
Comercial	5001	37.293	36.48 - 38.10	1343	10.015	9.51 - 10.53	1992	14.855	14.26 - 15.46	5074	37.837	37.02 - 38.66
<i>S. robustum</i>	2728	40.686	39.52 - 41.87	527	7.860	7.24 - 8.53	1037	15.466	14.62 - 16.36	2413	35.988	34.85 - 37.15
<i>S. barberi</i>	2142	39.933	38.63 - 41.25	484	9.023	8.28 - 9.82	951	17.729	16.73 - 18.78	1787	33.315	32.06 - 34.58
<i>S. spontaneum</i>	12848	39.920	39.39 - 40.46	3235	10.052	9.73 - 10.38	4709	14.631	14.25 - 15.02	11392	35.396	34.88 - 35.92
<i>S. officinarum</i>	6532	40.592	39.83 - 41.35	1549	9.626	9.18 - 10.10	2217	13.777	13.26 - 14.32	5794	36.005	35.27 - 36.75
<i>Erianthus</i>	2719	40.552	39.38 - 41.73	512	7.636	7.03 - 8.30	1049	15.645	14.80 - 16.54	2425	36.167	35.03 - 37.33

*IC (Intervalo de confiança) a 95% de probabilidade.

4.3. Metilação total relativa

Dentre os padrões de metilação obtidos pela genotipagem dos perfis moleculares, a metilação completa ou semi metilação da citosina interna e a semi metilação da citosina externa compõe a chamada metilação total relativa. Esta metilação representa toda a porção do epigenoma que está metilada, independente da citosina metilada do tetranucleotídeo 5' CCGG, ou seja, se é interna ou externa.

Os grupos referentes às cultivares comerciais, acessos de *S. robustum* e de *S. barberi* apresentaram a maior frequência de acessos metilados internamente quando utilizada a combinação seletiva 1 (*Eco* – ACA/ *Hpa*II/*Msp*I – TTG), considerando um intervalo de confiança a 95% de probabilidade. Apesar da porcentagem de metilação interna não diferir significativamente entre as combinações utilizadas para os demais grupos, a combinação 8 permitiu uma maior exploração de loci metilados internamente em acessos de *Erianthus*, assim como a combinação 11 para os acessos de *S. officinarum* (Figura 4, Tabela 6).

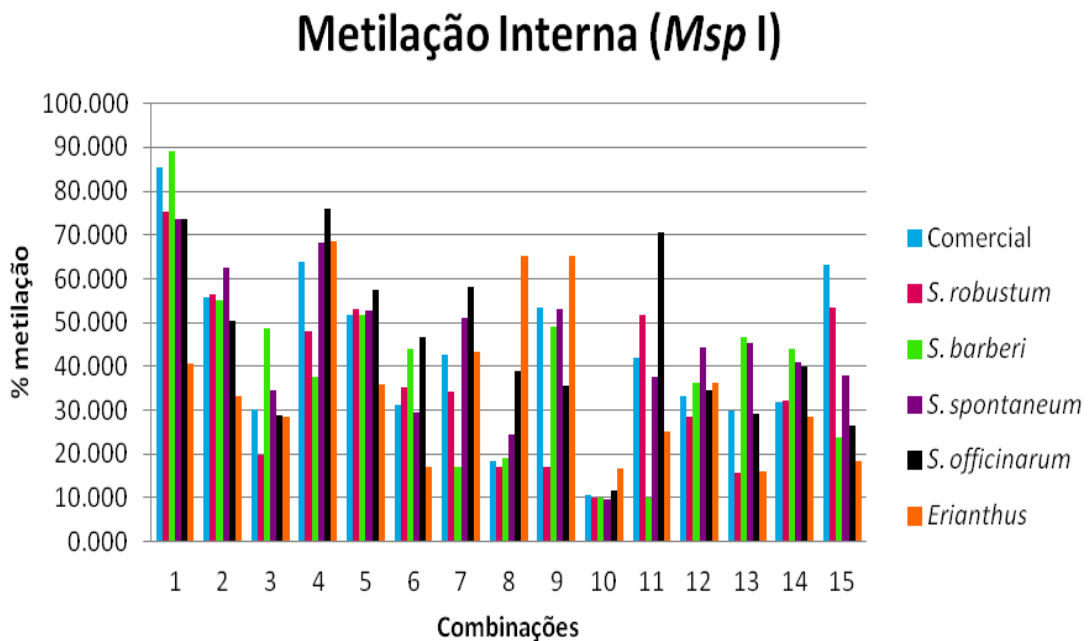


Figura 4 – Porcentagem de metilação interna de seis grupos de acessos de cana-de-açúcar utilizando 15 combinações de pares de primers seletivos (*Eco*RI/ *Hpa*II-*Msp*I).

Considerando a média das 15 combinações de primers seletivos utilizadas, o grupo composto pelos acessos de *S. officinarum* apresentou a maior frequência de indivíduos com metilação interna (41,130%, IC 95%: 39,57 a 42,71%), enquanto que a menor foi no grupo de acessos de *Erianthus* (32,800%; IC 95%: 30,52 a 35,17%). Ambas as médias não foram significativas a 95% de probabilidade, como visto na Tabela 6.

No padrão de semi-metilação externa, ou seja, corte apenas com a enzima *HpaII*, os grupos das cultivares comerciais, *S. spontaneum* e *S. officinarum* apresentaram maior porcentagem de loci quando utilizada a combinação 10 (*Eco* – *ACC/HpaII/MspI* – TTG). Dentre as combinações utilizadas, 2, 9 e 11, evidenciaram os loci metilados externamente dos grupos *Erianthus*, *S. robustum* e *S. barberi*, respectivamente, considerando um intervalo de confiança a 95% de probabilidade (Figura 5, Tabela 6).

Em média, o grupo de acessos de *Erianthus* apresentou o maior número de loci metilados externamente (67,200%; IC 95%: 64,83 a 69,48%), enquanto que *S. officinarum* o menor (58,870%; IC 95%: 57,29 a 60,43%), considerando as 15 combinações seletivas utilizadas. Porém, em nenhum dos casos os resultados apresentaram significância a 95% de probabilidade, como visto na Figura 5 e na Tabela 6.

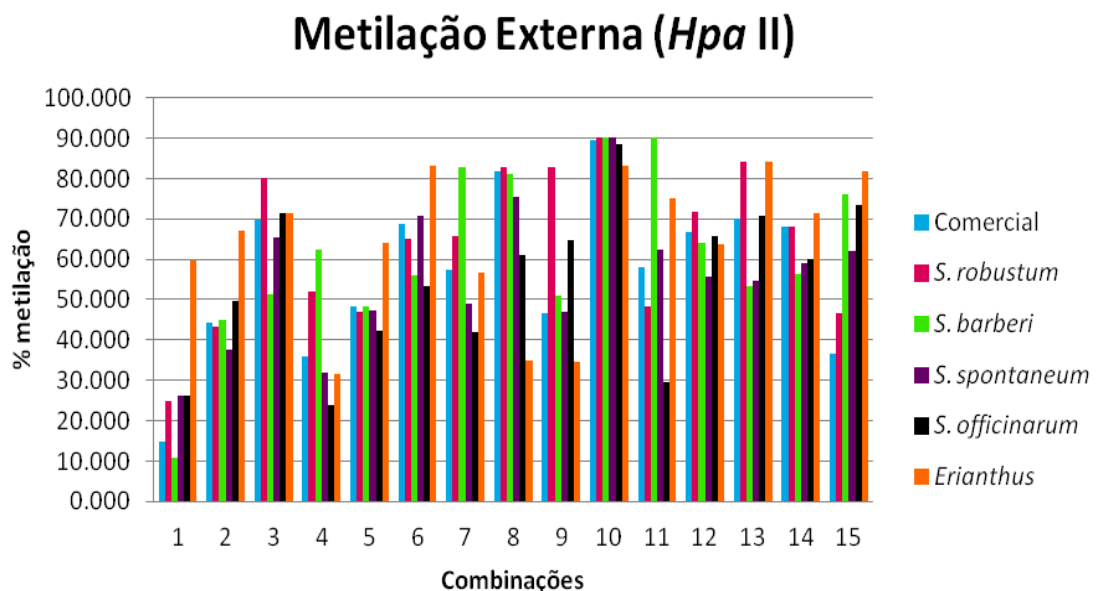


Figura 5 – Porcentagem de metilação externa de seis grupos de acessos de cana-de-açúcar utilizando 15 combinações de pares de primers seletivos (*EcoRI/HpaII/MspI*).

A maioria dos polimorfismos identificados nos acessos pertencentes aos seis grupos derivaram da combinação das enzimas *EcoRI/HpaII*, ou seja, devido à metilação da citosina externa.

Tabela 6 – Frequência e intervalo de confiança* (%) da metilação total relativa dos seis grupos de cana-de-açúcar para as 15 combinações seletivas.

C	Comercial		<i>S.robustum</i>		<i>S. barberi</i>		<i>S. spontaneum</i>		<i>S. officinarum</i>		<i>Erianthus</i>	
	Interna	Externa	Interna	Externa	Interna	Externa	Interna	Externa	Interna	Externa	Interna	Externa
1	85.321 80.01 - 89.41	14.679 10.59 - 19.99	75.248 66.01 - 82.64	24.752 17.36 - 33.99	89.063 79.10 - 94.60	10.938 5.40 - 20.90	73.636 69.33 - 77.54	26.364 22.46 - 30.67	73.750 66.43 - 79.95	26.250 20.05 - 33.57	40.426 31.07 - 50.54	59.574 49.46 - 68.93
2	55.629 47.66 - 63.32	44.371 36.68 - 52.34	56.566 46.74 - 65.91	43.434 34.09 - 53.26	55.172 42.45 - 67.25	44.828 32.75 - 57.55	62.570 57.45 - 67.42	37.430 32.58 - 42.55	50.267 43.17 - 57.36	49.733 42.64 - 56.83	33.058 25.31 - 41.85	66.942 58.15 - 74.69
3	30.147 23.07 - 38.32	69.853 61.68 - 76.93	19.737 12.34 - 30.05	80.263 69.95 - 87.66	48.649 37.61 - 59.82	51.351 40.18 - 62.39	34.528 30.61 - 36.68	65.472 61.32 - 69.39	28.632 23.22 - 34.73	71.368 65.27 - 76.78	28.431 20.58 - 37.84	71.569 62.12 - 79.42
4	63.934 56.75 - 70.54	36.066 29.46 - 43.25	47.887 36.68 - 59.32	52.113 40.68 - 63.32	37.500 26.01 - 50.59	62.500 49.41 - 73.99	68.132 63.18 - 72.71	31.868 27.29 - 36.82	76.042 69.53 - 81.53	23.958 18.47 - 30.47	68.519 55.26 - 79.32	31.481 20.68 - 44.74
5	51.636 45.75 - 57.48	48.364 42.52 - 54.25	53.077 44.54 - 61.45	46.923 38.55 - 55.46	51.685 41.46 - 61.79	48.315 38.21 - 58.54	52.632 48.46 - 56.77	47.368 43.23 - 51.54	57.600 51.40 - 63.57	42.400 36.43 - 48.60	35.938 28.15 - 44.55	64.063 55.45 - 71.85
6	31.188 25.20 - 37.88	68.812 62.12 - 74.80	35.106 26.22 - 45.17	64.894 54.83 - 73.78	44.000 33.33 - 55.25	56.000 44.75 - 66.67	29.412 25.49 - 33.65	70.588 66.35 - 74.51	46.698 40.10 - 53.41	53.302 46.59 - 59.90	17.000 10.89 - 25.55	83.000 74.45 - 89.11
7	42.632 35.81 - 49.74	57.368 50.26 - 64.19	34.211 24.54 - 45.40	65.789 54.60 - 75.46	17.037 11.63 - 24.27	82.963 75.73 - 88.37	50.939 46.21 - 55.66	49.061 44.34 - 53.79	58.077 52.01 - 63.92	41.923 36.08 - 47.99	43.434 34.09 - 53.26	56.566 46.74 - 65.91
8	18.327 14.03 - 23.58	81.673 76.42 - 85.97	17.164 11.71 - 24.44	82.836 75.56 - 88.29	18.898 13.04 - 26.58	81.102 73.42 - 86.96	24.481 20.85 - 28.51	75.519 71.49 - 79.15	38.889 32.64 - 45.53	61.111 54.47 - 67.36	65.169 54.83 - 74.25	34.831 25.75 - 45.17
9	53.469 47.22 - 59.61	46.531 40.39 - 52.78	17.073 11.44 - 24.69	82.927 75.31 - 88.56	48.936 39.08 - 58.89	51.064 41.11 - 60.92	52.941 48.60 - 57.23	47.059 42.77 - 51.40	35.424 29.97 - 41.28	64.576 58.72 - 70.03	65.278 53.76 - 75.25	34.722 24.75 - 46.24
10	10.613 8.02 - 13.90	89.387 86.10 - 91.98	9.950 6.53 - 14.87	90.050 85.13 - 93.47	9.816 6.14 - 15.35	90.184 84.65 - 93.86	9.713 8.08 - 11.62	90.287 88.38 - 91.92	11.586 9.20 - 14.50	88.414 85.50 - 90.80	16.766 11.87 - 23.17	83.234 76.83 - 88.13
11	42.045 35.00 - 49.44	57.955 50.56 - 65.00	51.786 39.01 - 64.34	48.214 35.66 - 60.99	9.924 5.89 - 16.23	90.076 83.77 - 94.11	37.702 34.08 - 41.71	62.298 58.61 - 66.23	70.507 64.13 - 76.18	29.493 23.82 - 35.87	25.000 17.13 - 34.96	75.000 65.04 - 82.87
12	33.182 27.29 - 39.64	66.818 60.36 - 72.71	28.302 20.60 - 37.52	71.698 62.48 - 79.40	36.047 26.70 - 46.59	63.953 53.41 - 73.30	44.400 40.10 - 48.78	55.600 51.22 - 59.90	34.434 28.36 - 41.05	65.566 58.95 - 71.64	36.170 27.18 - 46.25	63.830 53.75 - 72.82
13	29.787 23.71 - 36.68	70.213 63.32 - 76.29	15.789 9.81 - 24.43	84.211 75.57 - 90.18	46.753 36.03 - 57.78	53.247 42.22 - 63.97	45.232 40.47 - 50.08	54.768 49.92 - 59.53	29.224 23.60 - 35.56	70.776 64.44 - 76.40	15.888 10.16 - 23.98	84.112 76.02 - 89.84
14	31.935 27.00 - 37.32	68.065 62.68 - 73.00	32.061 24.68 - 40.46	67.939 59.54 - 75.32	43.810 34.70 - 53.35	56.190 46.65 - 65.30	41.064 37.41 - 44.81	58.936 55.19 - 62.59	39.812 34.59 - 45.27	60.188 54.73 - 65.41	28.440 20.82 - 37.53	71.560 62.47 - 79.18
15	63.253 55.69 - 70.21	36.747 29.79 - 44.31	53.521 42.04 - 64.64	46.479 35.36 - 57.96	23.762 16.52 - 32.92	76.238 67.08 - 83.48	37.931 33.87 - 42.17	62.069 57.83 - 66.13	26.563 21.53 - 32.29	73.438 67.51 - 78.65	18.248 12.68 - 25.55	81.752 74.45 - 87.32
M	40.270 38.62 - 41.94	59.730 58.06 - 61.38	33.700 31.40 - 36.08	66.300 63.92 - 68.60	33.730 31.33 - 36.22	66.270 63.78 - 68.67	40.720 39.64 - 41.80	59.280 58.20 - 60.36	41.130 39.57 - 42.71	58.870 57.29 - 60.43	32.800 30.52 - 35.17	67.200 64.83 - 69.48

* Intervalo de confiança considerando 95% de probabilidade.

C- Combinações; M – média.

4.4. Análise da estrutura epigenética

Considerando o epigenoma dos grupos analisados estruturalmente, foi revelada a presença de duas subpopulações no conjunto de acessos ($k=2$; $\Delta K=218.015$), como visto na Figura 6.

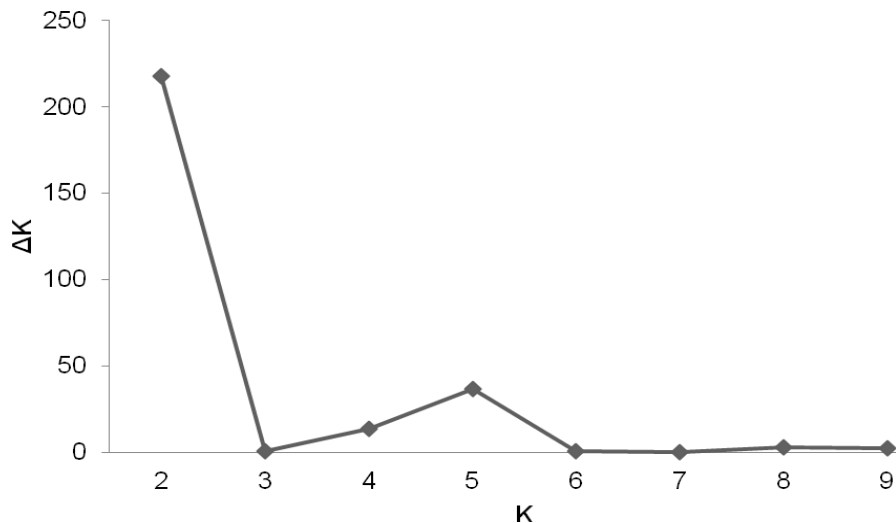


Figura 6 – Variação de delta K (Δk) em função do número de subpopulações (k).

Na Figura 7 observa-se a distribuição dos acessos e a porcentagem do epigenoma compartilhado entre todos os indivíduos.

De acordo com o resultado obtido, a primeira subpopulação, de coloração laranja, agrupou todos os acessos das cultivares comerciais e de *S. robustum*, a maioria de *S. barberi* e de *S. spontaneum*. Acessos como Chin (*S. barberi*) e US85108 (*S. spontaneum*) não apresentaram compartilhamento do seu epigenoma com outras espécies. Na segunda subpopulação, de coloração verde, foram agrupados todos os indivíduos de *S. officinarum*, *Erianthus* e os demais de *S. spontaneum* e de *S. barberi*, sendo que os acessos Taiwan *spontaneum* 072 e 064 (*S. spontaneum*), Badila e Muntok Java (*S. officinarum*) não mostraram compartilhamento do seu epigenoma com outras espécies, sugerindo que estes são considerados puros em seus respectivos grupos (Figura 7).

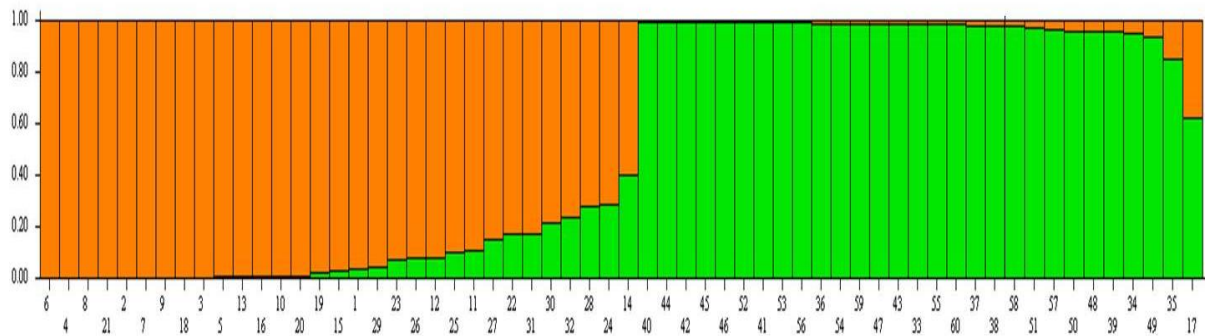


Figura 7 – Estrutura epigenética de acessos de cana-de-açúcar. Cada coluna indica um indivíduo, sendo a coloração referente à porcentagem em que este está inserido em cada subpopulação. Subpopulações: 1 – laranja; 2 – verde. Grupos: Comercial (1-10), *S. robustum* (11-15), *S. barberi* (17-20), *S. spontaneum* (16, 21-43), *S. officinarum* (44-55) e *Erianthus* (56- 60).

Através da Análise de Variância Molecular (AMOVA), foi observado que a maior parte da variabilidade epigenética está distribuída dentro dos grupos (91.38%), enquanto que apenas 8.62% ocorrem entre grupos. Com isso, o índice de diferenciação epigenética obtido foi de 8,62% ($\alpha= 0.001$) (Tabela 7).

Tabela 7 – Distribuição da variabilidade epigenética dentro e entre diferentes grupos de acessos de cana-de-açúcar subdivididos em duas subpopulações.

Fonte de variação	GL	SQ	Componentes de variância	% variação	Φ_{st}
Dentro dos grupos	58	11902.74	205.21967	91.38	0.08618
Entre grupos	1	785.176	19.35338	8.62	
Total	59	12687.92	224.57305		

Embora a análise realizada pelo programa STRUCTURE, na Figura 6, sugira que os acessos sejam agrupados em duas subpopulações devido à presença de um pico mais proeminente em $k=2$, é observado um segundo pico menor em $k=5$. Analisando o conjunto de acessos subdivididos em cinco subpopulações, observou-se que na primeira (verde) foram agrupados as cultivares comerciais e parte dos acessos de *S. barberi* e *S. robustum*. Os acessos de *S. spontaneum* foram reunidos na segunda (azul) e na terceira (vermelho) subpopulação, enquanto que todos os acessos de *S. officinarum* foram alocados na quarta (rosa) juntamente com o indivíduo IJ76-381, pertencente ao grupo *Erianthus*. Por fim, os demais acessos de *Erianthus* foram agrupados na última subpopulação (amarelo), como visto na Figura 8.

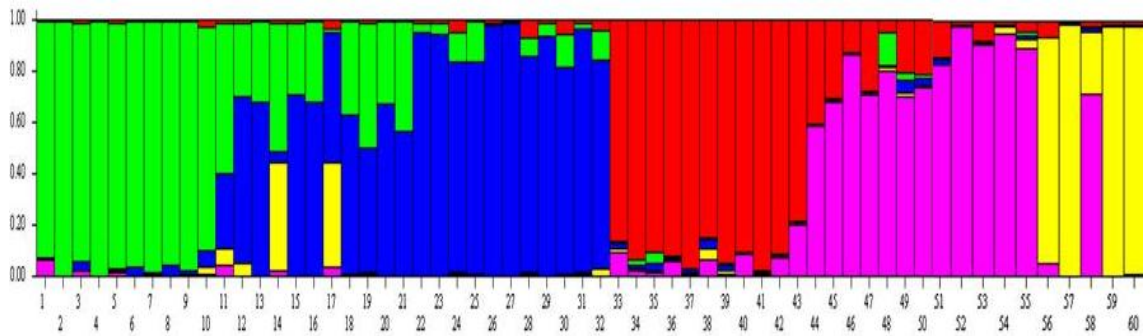


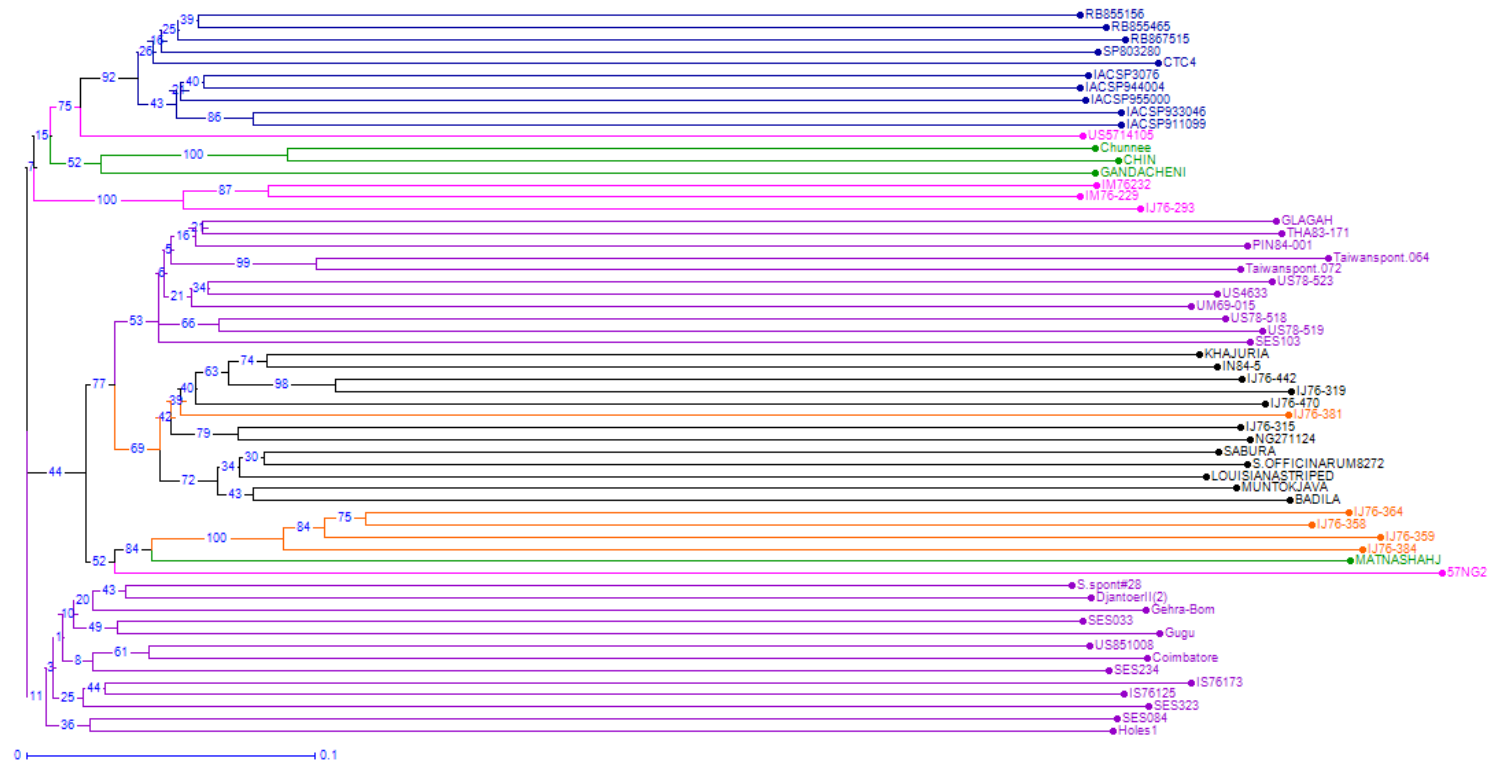
Figura 8 – Estrutura epigenética de acessos de cana-de-açúcar. Subpopulações: 1 – verde; 2 – azul; 3 – vermelho; 4 – rosa; 5 - amarelo. Grupos: Comercial (1-10), *S. robustum* (11-15), *S. barberi* (17-20), *S. spontaneum* (16, 21-43), *S. officinarum* (44-55) e *Erianthus* (56- 60).

A variância molecular entre os acessos distribuídos nas cinco subpopulações evidenciou que a variabilidade epigenética foi maior dentro dos grupos, como observado anteriormente (Tabela 8).

Tabela 8 – Distribuição da variabilidade epigenética dentro e entre diferentes grupos de acessos de cana-de-açúcar subdivididos em cinco subpopulações.

Fonte de variação	GL	SQ	Componentes de variância	% variação	Φ_{st}
Dentro dos grupos	55	10635.831	193.37875	87.45	0.1255
Entre grupos	1	2052.085	27.75478	12.55	
Total	59	12687.92	221.13353		

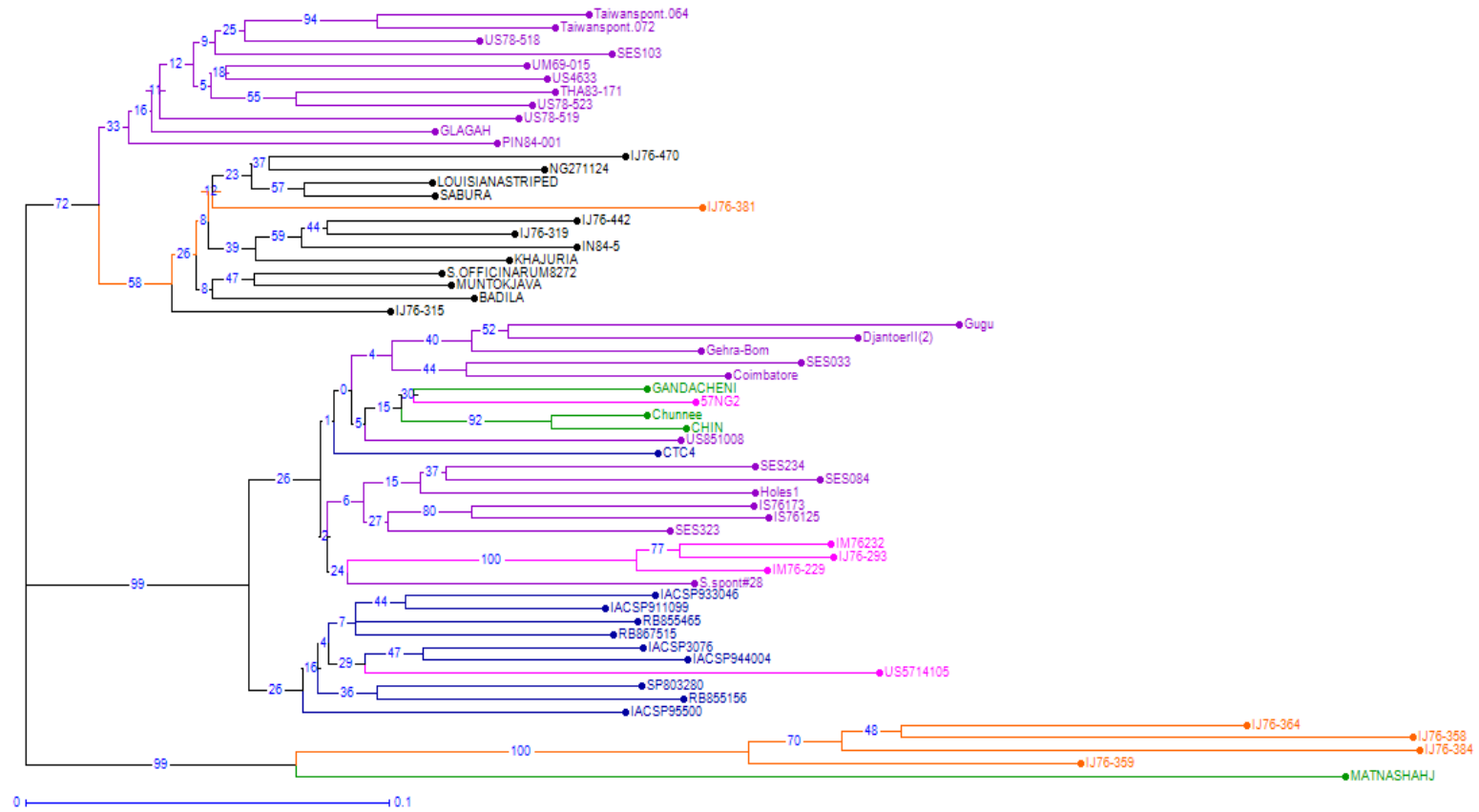
Considerando os loci polimórficos suscetíveis à metilação, os acessos de cana-de-açúcar foram separados em três grupos principais. O primeiro grupo reuniu acessos proveniente do grupo das cultivares comerciais e a maioria de *S. robustum* e *S. barberi*. No segundo foram alocados os demais acessos de *S. robustum* e de *S. barberi*, parte dos indivíduos de *S. spontaneum*, todos os acessos de *S. officinarum* e *Erianthus*, enquanto que no último grupo foram observados os demais acessos de *S. spontaneum* (Figura 9).



■ Comercial
 ■ *S. robustum*
 ■ *S. barberi*
 ■ *S. spontaneum*
 ■ *S. officinarum*
 ■ *Erianthus*

Figura 9 – Dendrograma dos acessos de cana-de-açúcar obtido pelo agrupamento *Neighbor Joining* para loci metilados com base na dissimilaridade (complemento do coeficiente de similaridade de Jaccard). Os valores de *bootstrap* em porcentagem estão apresentados nos nós de cada agrupamento.

Os loci polimórficos não suscetíveis à metilação, assim como os suscetíveis, foram subdivididos em três grupos principais. No primeiro foram agrupados indivíduos de *S. spontaneum*, *S. officinarum* e o acesso IJ76-381, previamente classificado como pertencente ao grupo de *Erianthus*. Os demais acessos de *S. spontaneum*, as cultivares comerciais e os acessos de *S. robustum* e *S. barberi* foram reunidos no segundo grupo. No último foram alocados o restante dos acessos de *Erianthus* e um acesso de *S. barberi* (Figura 10).



■ Comercial
 ■ *S. robustum*
■ *S. barberi*
■ *S. spontaneum*
■ *S. officinarum*
■ *Erianthus*

Figura 10 – Dendrograma dos acessos de cana-de-açúcar obtido pelo agrupamento *Neighbor Joining* dos loci não-metilados com base na dissimilaridade (complemento do coeficiente de similaridade de Jaccard). Os valores de *bootstrap* em porcentagem estão apresentados nos nós de cada agrupamento.

5. DISCUSSÃO

Embora a caracterização da variabilidade genética dos acessos do “complexo *Saccharum*” ter sido amplamente estudada via marcadores moleculares (AITKEN; MCNEIL, 2010; QUE et al., 2014; LIU et al., 2016; SING et al., 2017), não há relatos, até o presente momento, da investigação da variabilidade genética ao nível do epigenoma. Considerando que essas modificações epigenéticas constituem-se em processos herdáveis que permitem uma adaptação mais rápida dos organismos aos ambientes com condições distintas (HEARD; MARTIENSSEN, 2014), a investigação da metilação de DNA em acessos de cana-de-açúcar pode lançar um novo olhar sob a evolução genômica desta espécie.

Em virtude da Coleção de germoplasma do Programa de Melhoramento de Cana-de-Açúcar do IAC conter poucos acessos das espécies *S. barberi*, *S. robustum* e *Erianthus* sp, a representatividade epigenética para estas espécies ficou comprometida. Espécies como *S. spontaneum* e *S. officinarum*, responsáveis pela constituição do genoma da maioria das cultivares atuais, foram representadas por um número maior de acessos, 24 e 12, respectivamente. Contudo, as análises permitiram que fossem detectadas diferenças significativas entre as espécies investigadas quanto à frequência dos padrões de metilação.

A diversidade genética dos 60 acessos utilizados neste trabalho foi estimada segundo os padrões de metilação propostos por Schulz, Eckstein e Durka (2013). O número de loci suscetíveis a metilação (MSL) foi significativamente maior do que o de não suscetíveis a metilação (NML), resultando em uma variabilidade epigenética maior do que a genética. Resultados semelhantes foram observados em outras espécies como *Populus tomentosa* (MA et al., 2013), *Pinus pinea* (SÁEZ-LAGUNA et al., 2014) e *Populus alba* (GUARINO et al., 2015). De fato, por serem muito influenciadas por fatores abióticos, as variações epigenéticas ocorrem em maior frequência (SONG; CHEN, 2015).

Independente das alterações genéticas, os mecanismos epigenéticos podem contribuir para a variabilidade fenotípica e adaptação de plantas poliploides em ambientes distintos, devido à capacidade de regulação da expressão gênica,

silenciamento de genes duplicados e alteração da plasticidade fenotípica (BOSSDORF et al., 2010; VOGT, 2017). Segundo Latzel et al. (2013), a metilação do DNA está diretamente relacionada ao fenômeno de plasticidade fenotípica, ou seja, a capacidade de um genótipo em expressar fenótipos distintos em ambientes diferentes, influenciando características como florescimento, altura de planta e teor de biomassa (PIGLIUCCI; MURREN; SCHLICHTING, 2006; ZHANG et al., 2013).

No total, 15 combinações seletivas foram utilizadas para a investigação da metilação do genoma das principais espécies que compõem o germoplasma básico da cana-de-açúcar, além de cultivares comerciais utilizadas pelos produtores da cultura. Diferenças quanto à capacidade destas combinações em revelar regiões com maior probabilidade de metilação da citosina foram observadas e avaliadas segundo o conteúdo de informação de polimorfismo (PIC). Este parâmetro varia de 0 – 0,5 para marcadores dominantes, tal como os marcadores obtidos pela técnica de MSAP, sendo que quanto maior o valor, mais polimórfica é a combinação. A combinação 10 (*Eco* – ACC/ *HpaII/MspI* – TTG) capturou o maior número de loci suscetíveis a metilação e apresentou o maior valor de PIC (0,394) e, apesar de explorar o menor número de loci, a combinação 8 (*Eco* – AGA/ *HpaII/MspI* – TTG) apontou o segundo maior valor de PIC (0,370), mostrando-se como uma boa combinação para fornecer informações para o estudo da diversidade epigenética entre os acessos.

Analisando a frequência de ausência de metilação, as cultivares comerciais diferiram significativamente em relação ao germoplasma básico, sinalizando para uma maior metilação do genoma das cultivares. Tal resultado talvez pode ser atribuído ao processo de melhoramento genético, no qual, as cultivares são selecionadas não apenas para o aumento da produtividade como também para a tolerância a estresses bióticos e abióticos, mostrando que a alteração epigenética atua como um fator de adaptabilidade.

Os seis grupos de acessos não diferiram significativamente entre si quanto à frequência de metilação da citosina interna. Porém, analisando este mesmo padrão de metilação, pode-se observar diferenças significativas entre as cultivares comerciais e o germoplasma básico (grupos de acessos). *Saccharum robustum* e *Erianthus* exibiram uma frequência de metilação interna significativamente menor do

que a das cultivares. Provavelmente, este resultado pode ser atribuído a pouca participação de ambas as espécies na constituição das cultivares atuais. De acordo com Arceneaux (1967), apenas 19 acessos de *S. officinarum*, dois acessos de *S. spontaneum*, quatro de *S. sinense* e um de *S. robustum* foram utilizadas como genitores nos primeiros intercruzamentos. A maior frequência de semi-metilação da citosina externa foi observada para *S. barberi*, diferindo significativamente entre os demais grupos.

A metilação total relativa, a qual representa toda a porção do epigenoma que está metilada, foi menor que a ausência de metilação para as espécies e cultivares avaliadas. *Saccharum robustum*, *S. barberi* e as cultivares comerciais apresentaram maior frequência de acessos metilados internamente quando utilizada a combinação 1 (*Eco* – *ACA*/*HpaII*/*MspI* – TTG), enquanto a combinação 10 (*Eco* – *ACC*/*HpaII*/*MspI* – TTG) capturou a maior frequência de metilação externa entre as cultivares comerciais, *S. spontaneum* e *S. officinarum*. A utilização de uma combinação seletiva espécie-específica pode auxiliar na investigação de determinado tipo de padrão de metilação, permitindo a exploração epigenética mais detalhada de uma determinada espécie. Segundo Alonso et al. (2016), o padrão de metilação varia entre espécies devido a este ser extremamente influenciado por fatores abióticos, como adubação (KIM; IM; NKONGOLO, 2016) e origem geográfica (VENETSKY et al., 2015). Os 50 acessos utilizados neste estudo são provenientes da coleção de germoplasma de Miami e, atualmente, são mantidos no jardim clonal do IAC, Centro de Cana de Ribeirão Preto, em condições homogêneas. Porém, os mesmos são originados de diferentes regiões, como visto na Tabela 1, o que pode influenciar a frequência de metilação das espécies.

Comparando os dois isosquisomeros (*HpaII* e *MspI*) quanto a frequência de corte, a enzima *HpaII* atuou de forma mais expressiva para todas as espécies avaliadas e cultivares comerciais. Conseqüentemente, considerando apenas a parte metilada do genoma, a frequência de semi-metilação da citosina externa foi significativamente maior do que a metilação da citosina interna em todos os acessos. Estudos realizados a partir de folhas de espécies perenes como *Populus tomentosa* (MA et al., 2013) e *P. alba* (GUARINO et al., 2015) apresentaram padrões igualmente mais elevados quando utilizada a enzima de restrição *HpaII*. Porém, Ma

et al. (2012) analisando a mesma espécie a partir de tecido proveniente do tronco obtiveram resultado inverso, sendo mais frequente o padrão de metilação da citosina interna, mostrando que a metilação do DNA é uma alteração tecido-específica. Neste estudo, todos os acessos analisados tiveram DNA extraído a partir de folhas, a fim de padronizar o tecido analisado e permitir a comparação dos acessos ao nível epigenético.

A estrutura epigenética dos acessos de cana-de-açúcar foi aferida através do programa STRUCTURE, sendo estes agrupados em dois ($k=2$) e cinco ($k=5$) subgrupos. Considerando a primeira subdivisão, alguns grupos, como *S. spontaneum* e *S. barberi*, apresentaram acessos distribuídos nos dois subgrupos. Observou-se que todos os genótipos comerciais foram alocados na primeira subpopulação, indicando pouco ou nenhum compartilhamento das regiões epigenéticas avaliadas com o segundo grupo. Isto provavelmente ocorreu devido a estes genótipos terem passado por diversos processos de seleção, como indicado anteriormente. Contudo, o valor de $k=2$ pode ter ocorrido devido ao número restrito de acessos utilizados neste trabalho, sendo que em populações maiores os mesmos poderiam ser subdivididos em um maior número de grupos, tendo em vista que as análises anteriores indicam diferenças entre os seis grupos analisados.

Em contrapartida, o resultado de $k=5$ permitiu uma subdivisão dos acessos de forma mais coerente quanto ao número inicial de espécies em que os mesmos estavam alocados. Neste arranjo, as cultivares comerciais permaneceram no mesmo grupo, como visto anteriormente, mas apresentaram participações de outras subpopulações na constituição de seu epigenoma, especialmente das populações que contém acessos de *S. spontaneum* e *S. officinarum*, espécies estas que tiveram maior participação na constituição do genoma das cultivares comerciais. No caso do uso do marcador MSAP, considerado dominante, o modelo *admixture* é tido como o mais adequado para análise da estrutura de acessos ao nível do epigenoma, uma vez que considera que os indivíduos apresentam ancestralidade mista e permite a identificação de padrões herdados em gerações anteriores à analisada (FALUSH; STEPHENS; PRITCHARD, 2007; CI et al., 2016).

Considerando as duas possíveis subdivisões dos acessos e cultivares comerciais (em duas ou cinco subpopulações), determinados pelo programa

STRUCTURE, a variância molecular epigenética dentro de grupos foi significativamente maior do que entre, com um valor de diferenciação epigenética de 8.60% e 12,55%, respectivamente. Segundo Wright (1958), valores de F_{ST} , índice análogo ao ϕ_{st} , entre 0,05 e 0,15 indicam diferenciação genética moderada entre os indivíduos analisados. Espécies pertencentes ao “complexo *Saccharum*” apresentam maior diferenciação genética dentro das populações do que entre (GLYNN; McCORKLE; COMSTOCK, 2009; NAYAK et al., 2014).

Analisando os nós formados no dendrograma dos loci suscetíveis a metilação, observou-se que os valores presentes nas três ramificações do mesmo são considerados baixos, como visto na Figura 9 (7, 44 e 11, respectivamente). Segundo Hillis e Bull (1993), apenas valores de *bootstrap* acima de 70 são considerados confiáveis na formação de uma árvore filogenética. Entretanto, segundo estes autores, a probabilidade de serem obtidos valores altos neste tipo de amostragem pode ser reduzida devido ao número de repetições e o tipo de estudo realizado.

Os acessos de *Saccharum spontaneum* foram agrupados em dois grupos distintos, considerando os loci polimórficos suscetíveis a metilação. Tal separação pode ser atribuída, em parte, ao fato de *S. spontaneum* ser considerada uma espécie extremamente polimórfica, devido à variação do número cromossômico e de citótipos e da ampla distribuição geográfica (AITKEN; MCNEIL, 2010; CHEAVEGATTI-GIANOTTO et al., 2011; DA SILVA, 2017). Além disso, segundo Da Silva (2017), acessos de *S. spontaneum* apresentam níveis distintos de tolerância aos fatores abióticos, como amplas temperaturas e condições extremas de solo. Essas características apresentam uma relação estreita com a metilação de DNA, uma vez que diferentes áreas e condições de cultivo, poliploidização e hibridização promovem alterações nas taxas de metilação do DNA, atuando como um mecanismo de regulação das plantas (SONG; CHEN, 2015; SUO; DONG; KANG, 2015).

Além disso, foi observado que os acessos utilizados neste trabalho foram agrupados segundo a distribuição realizada pelo programa STRUCTURE, que considerou estes provenientes de ancestralidade mista, sendo alocados em dois subgrupos. No primeiro e no terceiro grupo do dendrograma foram alocados acessos

provenientes do subgrupo 1, enquanto, no segundo, todos os acessos do subgrupo 2.

A variação genética dos acessos foi evidenciada através do dendrograma dos polimorfismos não suscetíveis à metilação. O acesso IJ76-381, inicialmente classificado como pertencente à espécie *Erianthus* sp, foi alocado no primeiro grupo juntamente com acessos de *S. officinarum*. Segundo a base de dados GRIN (<https://www.ars-grin.gov/>), este acesso passou a ser catalogado como sendo proveniente da espécie *Saccharum arundinaceum*, explicando sua proximidade genética aos demais acessos do gênero *Saccharum*. No segundo grupo, os acessos foram reunidos de acordo com a sua ancestralidade, i.e., acessos de *S. barberi* cuja origem deriva de cruzamentos naturais entre *S. officinarum* e *S. spontaneum* (D'HONT; PAULET; GLASZMANN, 2002) ficaram próximos às respectivas espécies, assim como as cultivares comerciais se agruparam próximas aos acessos de *S. spontaneum* (D'HONT et al., 1998; IRVINE, 1999). Por fim, o terceiro grupo foi composto por acessos pertencentes ao gênero *Erianthus* e ao acesso MATNA SHAHJ tido como *S. barberi*, sinalizando que este acesso possa ter sido trocado uma vez que se apresenta epigeneticamente semelhante ao grupo de *Erianthus*.

6. CONCLUSÃO

Este estudo sinalizou que existem diferenças nos padrões de metilação da citosina interna e semi-metilação da citosina externa entre algumas das espécies que constituem o germoplasma básico da cana-de-açúcar. Porém, a maioria dos polimorfismos identificados nos seis grupos analisados ocorreu devido à metilação da citosina externa. As cultivares comerciais apresentaram o epigenoma mais metilado dentre os acessos analisados. Além disso, o uso de combinações de primers específicas para cada espécie permitiram a exploração de loci metilados de maneira mais efetiva.

A partir deste primeiro relato a respeito das modificações epigenéticas na cana-de-açúcar, outros estudos poderão ser realizados a fim de auxiliar a seleção de genótipos para os programas de melhoramento, levando em consideração esta modificação presente nos acessos que compõe o “complexo *Saccharum*”.

7. REFERÊNCIAS

AITKEN, K. S.; LI, J. C.; JACKSON, P.; PIPERIDIS, G.; MCINTYRE, C. L. AFLP analysis of genetic diversity within *Saccharum officinarum* and comparison with sugarcane cultivars. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 57, n. 11, p. 1167-1184, 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.1071/AR05391>>.

AITKEN, K. S.; MCNEIL, M. Diversity analysis. In: Henry, R.; Kole. MC. (Eds.). **Genetics, Genomics and Breeding of Sugarcane**. 1. ed. New York: Science Publishers, 2010. Cap. 3, 19–42.

ALONSO, C.; PÉREZ, R.; BAZAGA, P.; MEDRANO, M.; HERRERA, C. M. MSAP markers and global cytosine methylation in plants: a literature survey and comparative analysis for a wild-growing species. **Molecular Ecology Resources**, v. 16, p.80-90, 2016.

ALWALA, S.; KIMBEND, C.A. Molecular genetic linkage mapping in *Saccharum*: strategies, resources, and achievements. In: HENRY, R.; CHITTARANJAN, K. (Eds.) **Genetics, Genomics and Breeding of Sugarcane**. 1. ed. New York: Science Publishers, 2010. Cap. 5, p.69-96, 2010.

AMARAL, A. L. DO; SANTOS, J. M. DOS; BARBOSA, G. V. DE S. **Denominação de cultivares de cana-de-açúcar como suporte à documentação e utilização do germoplasma conservado**. 1.ed. Aracaju : Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2015. 31 p.

ARCENEUX, G. Cultivated Sugarcane of the World and their Botanical Derivation. **Proceedings of International Society of Sugar Cane Technologists**, p. 844–854, 1967.

ARTSCHWAGER, E. **A taxonomic study of *Saccharum sinense* Roxb and *S. barberi* Jeswiet**. Washington, DC: USDA. 87 p., 1954.

AUSTRALIAN GOVERNMENT. **The Biology and Ecology of Sugarcane (*Saccharum* spp. hybrids) in Australia**. Disponível em: <[http://www.oqtr.gov.au/internet/oqtr/publishing.nsf/content/sugarcane-3/\\$FILE/biologysugarcane.pdf](http://www.oqtr.gov.au/internet/oqtr/publishing.nsf/content/sugarcane-3/$FILE/biologysugarcane.pdf)>. Acesso em: 06 abr., 2017.

AUSTRALIAN GOVERNMENT. **Use and improvement of sugarcane germplasm.** Disponível em: <http://aci-ar.gov.au/files/node/12137/final_report_2010_11_15229.pdf>. Acesso em: 08 out. 2017.

BARBOSA, M.H.P.; RESENDE, M.D.; SILVEIRA, L.C.I.; PETERNELLI, L.A. Estratégias de melhoramento genético da cana-de-açúcar em universidades. In: IX Simpósio sobre seleção recorrente, 9., 2005, Lavras. **Anais ...** Lavras: UFLA, 2005. p.43-57.

BEDNAREK, P. T.; ORLOWSKA, R.; NIEDZIELA, A. A relative quantitative Methylation-Sensitive Amplified Polymorphism (MSAP) method for the analysis of abiotic stress. **BMC Plant Biology**, v. 17, 2017.

BOCK, C. Analysing and interpreting DNA methylation data. **Nature Reviews Genetics**, v. 13, p. 705–719, 2012.

BOSSDORF, O.; ARCURI, D.; RICHARDS, C. L.; PIGLIUCCI, M. Experimental alteration of DNA methylation affects the phenotypic plasticity of ecologically relevant traits in *Arabidopsis thaliana*. **Evolutionary Ecology**, v. 24, p. 541–553, 2010.

BROWN, J. S.; SCHNELL, R. J.; POWER, E. J.; 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, p.627-648, 2007. Disponível em: < DOI10.1007/s10722-006-0035-z >.

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

CAIEIRO, J. T.; PANOBIANCO, M.; BESPALHOK FILHO, J. C.; OHLSON, O. C. Physical purity and germination of sugarcane seeds (Caryopses) (*Saccharum* spp.). **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v.32, n.2, p.140-145, 2010.

CASAGRANDE, A. A.; VASCONCELOS, C. M. Fisiologia da parte aérea. In: DINARDO-MIRANDA, L.L.; VASCONCELOS, A. C. M.; LANDELL, M. G. de A. (Eds.). **Cana-de-açúcar**. 1 ed. Campinas: Instituto Agrônômico, 2008. v. 1, p. 57-78.

CHANG, D.; YANG, F. Y.; YAN, J. J.; WU, Y. Q.; BAI, S. Q.; LIANG, X. Z.; ZHANG, Y. W.; GAN, Y. M. SRAP analysis of genetic diversity of nine native populations of wild sugarcane, *Saccharum spontaneum* from Sichuan, China. **Genetics and Molecular Research**, v. 11, n. 2, p.1245-1253, 2012.

CHEAVEGATTI-GIANOTTO, A.; de ABREU, H. M. C.; ARRUDA, P.; BESPALHOK FILHO, J. C.; BURNQUIST, W. L.; CRESTE, S.; DI CIERO, L.; FERRO, J. A.; FIGUEIRA, A. V. de O.; FILGUEIRAS, T. de S.; GROSSI-DE-SÁ, M. DE F.; GUZZO, E. C.; HOFFMANN, H. P.; LANDELL, M. G. DE A.; MACEDO, N.; MATSUOKA, S.; REINACH, F. de C.; ROMANO, E.; DA SILVA, W. J.; SILVA FILHO, M. de C.; ULIAN, E. C. Sugarcane (*Saccharum X officinarum*): A reference study for the regulation of genetically modified cultivars in Brazil. **Tropical Plant Biology**, p.62-89, 2011.

CI, D.; SONG, Y.; DU, Q.; TIAN, M.; HAN, S.; ZHANG, D. Variation in genomic methylation in natural populations of *Populus simonii* is associated with leaf shape and photosynthetic traits. **Journal of Experimental Botany**, v. 67, n. 3, p. 723-737, 2016.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento safra brasileira de cana-de-açúcar – Safra 2016/17 – Quarto Levantamento**. Brasília, abril, 2017. v. 3, n. 4, 82 p. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/17_04_19_11_27_36_boletim_cana_portugues_-_4o_lev_-_16-17.pdf>. Acesso em: 15 fev. 2018.

CRESTE, S.; JUNIOR, V. E. R.; PINTO, L. R.; ALBINO, J. C.; FIGUEIRA, A. V. O. A biotecnologia como ferramenta para o melhoramento genético. In: DINARDOMIRANDA, L. L.; VASCONCELOS, A. C. M. de; LANDELL, M. G. A. (Eds.). **Cana-de-açúcar**. 1ª ed. Campinas: Instituto Agrônômico, 2008. cap.6, v. 1, p. 157-176.

D'ALESSIO, A. C.; SZYF, M. Epigenetic tête-à-tête: the bilateral relationship between chromatin modifications and DNA methylation. **Biochem. Cell Biol.**, v.84, p. 463-476, 2006.

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, 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, p. 253–262, 2002.

D'HONT, A.; RAO, P.; FELDMANN, P.; GRIVET, L.; ISLAM-FARIDI, N.; TAYLOR, P.; GLASZMANN, J.C. Identification and characterization of intergeneric hybrids, *S officinarum* × *Erianthus arundinaceus*, with molecular markers and in situ hybridization. **Theor Appl Genet**, 91, p. 320–326, 1995.

DA SILVA, J. A. The importance of the wild cane *Saccharum spontaneum* for bioenergy genetic breeding. **Sugar Tech**, v. 19, n. 3, p. 229-240, 2017.

DA SILVA, J. A.; VEREMIS, J.; SOLÍS-GRACIA, N. *Saccharum spontaneum* gene tagging by markers developed from sugarcane expressed sequence tags. **Subtropical Plant Science**, v. 58, p. 6–14, 2007.

DANIELS, J.; ROACH, B. T. Taxonomy and evolution in sugarcane. In: HEINZ, D. J. (Ed.). **Sugarcane improvement through breeding**. Amsterdam: Elsevier Press, 1987. p. 7-84.

DANIELS, J.; SMITH, P.; PATON, N. The origin of sugarcane and centers of genetic diversity in *Saccharum*. **Sugarcane Breeding Newsletter**, v. 35, p. 4-18, 1975.

DE MORAIS, L. K.; CURSI, D. E.; DOS SANTOS, J. M.; SAMPAIO, M.; CÂMARA, T. M. M.; SILVA, P. DE A.; BARBOSA, G. V.; HOFFMANN, H. P.; CHAPOLA, R. G.; FERNANDES JÚNIOR, A. R.; GAZAFFI, R. **Melhoramento genético de cana-de-açúcar**. 1.ed. Aracaju : Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2015. 38 p. Disponível em: <<https://www.bdpa.cnptia.embrapa.br>>. Acesso em: 27 mar. 2017.

DUNCAN, E. J.; GLUCKMAN, P. D.; DEARDEN, P.K. Epigenetics, Plasticity, and Evolution: How do We Link Epigenetic Change to Phenotype? **Journal of Experimental Zoology (Molecular and developmental evolution)**, v. 322, n. 4, p. 208-220, 2014.

EARL, D. A.; VONHOLDT, B. M. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. **Conservation Genetics Resources**, v. 4, n. 2, p. 359-361, 2012. Disponível em: <DOI:10.1007/s12686-011-9548-7>.

EPE - Empresa de Pesquisa Energética (Brasil). **Balço Energético Nacional 2016: Ano base 2015 / Empresa de Pesquisa Energética**. Rio de Janeiro, 2016. 292 p.

EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. **Molecular Ecology**, v. 14, p. 2611-2620, 2005. Disponível em: <doi:10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x>.

EXCOFFIER, L.; LISCHER, H. E. L. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular Ecology Resources**, v. 10, p. 564–567, 2010. Disponível em: <doi:10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x>.

FALUSH, D.; STEPHENS, M.; PRITCHARD, J. Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. **Molecular Ecology Notes**, v. 7, p.574-578, 2007.

FAN, L. N.; DENG, H. H.; LUO, Q. W.; HE, H. Y.; LI, Y.; WANG, Q. N.; HUANG, Z. X.; WU, J. T.; LI, Q. W.; LIU, S. M.; QI, Y. W. Genetic diversity of *Saccharum spontaneum* from geographical regions of China assessed by simple sequence repeats. **Genetics and Molecular Research**, v. 12, n. 4, p. 5916-5925, 2013.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3ª ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220p. Disponível em: <<https://www.bdpa.cnptia.embrapa.br>>. Acesso em: 24 abr. 2017.

FIGUEIREDO, P. Breve história da cana-de-açúcar e do papel do instituto agrônomo no seu estabelecimento no Brasil. In: DINARDO-MIRANDA, L.L.; VASCONCELOS, A.C.M.; LANDELL, M.G. de A. (Eds.). **Cana-de-açúcar**. 1 ed. Campinas: Instituto Agrônomo, 2008. cap. 1, v.1, p.31-44.

FRANCISCHINI, J. H. M. B.; KEMPER, E. L.; COSTA, J. B.; MANECHINI, J. R. V.; PINTO, L. R. DNAmethylation insugarcane somaclonal variants assessed through methylation-sensitive amplified polymorphism. **Genetics and Molecular Research**, v. 16, 2017.

FUJIMOTO, R.; SASAKI, T.; ISHIKAWA, R.; OSABE, K.; KAWANABE, T.; DENNIS, E. S. Molecular mechanisms of epigenetic variation in plants. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, p. 9900–9922, 2012.

GARCIA, A.F.; MOLLINARI, M.; MARCONI, T.G.; SERANG, O.R.; SILVA, R.R.; VIEIRA, M.L.C.; VICENTINI, R.; COSTA, E.A.; MANCINI, M.C.; GARCIA, M.O.S.; PASTINA, M.M.; GAZAFFI, R.; MARTINS, E.R.F.; DAHMER, N.; SFORÇA, D.A.; SILVA, C.B.C.; BUNDOCK, P.; HENRY, R.J.; SOUZA, G.M.; VAN SLUYS, M.A.; LANDELL, M.G.A.; CARNEIRO, M.S.; VINCENTZ, M.A.G.; PINTO, L.R.; VENCOVSKY, R.; SOUZA, A.P. SNP genotyping allows an in-depth characterisation of the genome of sugarcane and other complex autopolyploids. **Scientific Reports**, 3: 3399, p. 1-10, 2013.

GLYNN, N. C.; MCCORKLE, K.; COMSTOCK, J. C. Diversity among mainland USA sugarcane cultivars examined by SSR genotyping. **Journal of the American Society of Sugarcane Technologists**, v. 29, p. 36-52, 2009.

GRANT-DOWNTON, R.T.; DICKINSON, H.G. Epigenetics and its implications for plant biology. 1. The epigenetic network in plants. **Annals of Botany**, v. 96, p. 1143-1164, 2005.

GRIVET, L.; DANIELS, C.; GLASZMANN, J.C.; D'HONT, A. A review of recent molecular genetics evidence for sugarcane evolution and domestication. **Ethnobotany Research and Applications**, Honolulu, v. 2, p. 9-17, 2004.

GUARINO, F.; CICALTELLI, A.; BUNDU, G.; HEINZE, B.; CASTIGLIONE, S. Epigenetic Diversity of Clonal White Poplar (*Populus alba* L.) Populations: Could Methylation Support the Success of Vegetative Reproduction Strategy?. **PLOS ONE**, v. 10, n. 7, 2015.

HAHN, M. A.; VAN KLEUNEN, M., MULLER-SCHARER, H. Increased Phenotypic Plasticity to Climate May Have Boosted the Invasion Success of Polyploid *Centaurea stoebe*. **PLOS ONE**, v. 7, 2012.

HEARD, E.; MARTIENSSSEN, R. A. Transgenerational Epigenetic Inheritance: myths and mechanisms. **Cell**, v. 157, n.1, p. 95-109, 2014.

HENRY, R. J. Basic Information on the Sugarcane Plant. In: HENRY, R. J.; KOLE, C. **Genetics, genomics and breeding of sugarcane**. 1. ed. New York: Science Publishers, 2010. cap.1, p.1-7.

HERRERA, C. M.; BAZAGA, P. Epigenetic differentiation and relationship to adaptive genetic divergence in discrete populations of the violet *Viola cazorlensis*. **New Phytologist**, v.187, p. 867-876, 2010.

HILLIS, D. M.; BULL, J. J. An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. **Systematic Biology**, v. 42, n.2, p. 182-192, 1993.

HITCHCOCK, A.S. Type species of the first 100 genera of Linnaeus "Species Plantarum". **Botanical Society of America**, v.10, n.9, p.510-514, novembro, 1923.

HOANG, N. V.; FURTADO, A.; BOTHA, F. C.; SIMMONS, B. A.; HENRY, R. J. Potential for Genetic Improvement of Sugarcane as a Source of Biomass for Biofuels. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 3, p. 1-15, 2015.

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

JONES, A. L.; SUNG, S. Mechanisms underlying epigenetic regulation in *Arabidopsis thaliana*. **Integrative and Comparative Biology**, v. 54, n. 1, p. 61-67, 2014.

KALISZ, S.; PURUGGANAN, M. D. Epialleles via DNA methylation: consequences for plant evolution. **Trends in Ecology and Evolution**, v.19, n. 6, p. 309-314, 2004.

KEYTE, A. L.; PERCIFIELD, R.; LIU, B.; WENDEL, J. F. Intraspecific DNA methylation polymorphism in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). **Journal of Heredity**, v. 97, n.5, p. 444–450, 2006.

KIM, M. S.; DAY, D. F. Composition of sugar cane, energy cane, and sweet sorghum suitable for ethanol production at Louisiana sugar mills. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 38(7), p. 803–807, 2010.

KIM, N-S.; IM, M-J.; NKONGOLO, K. Determination of DNA methylation associated with *Acer rubrum* (red maple) adaptation to metals: analysis of global DNA modifications and methylation-sensitive amplified polymorphism. **Ecology and Evolution**, v. 6, n. 16, p. 5749-5760, 2016.

KURDYUKOV, S.; BULLOCK, M. DNA Methylation Analysis: Choosing the Right Method. **Biology**, v. 5, n.3, 2016.

LANDELL, M. G. de A.; BRESSIANI, J. A. Melhoramento genético, caracterização e manejo varietal. In: DINARDO-MIRANDA, L.L.; VASCONCELOS, A. C. M.; LANDELL, M. G. de A. (Eds.). **Cana-de-açúcar**. 1 ed. Campinas: Instituto Agrônomo, 2008. v. 1, p. 101-155.

LANZA, M. A.; GUIMARÃES, C. T.; SCHUSTER, I. Aplicação de marcadores moleculares no melhoramento genético. **Informe agropecuário**, v. 21, n. 204, p. 97-108, 2000.

LATZEL, V.; ALLAN, E.; SILVEIRA, A. B.; COLOT, V.; FISCHER, M.; BOSSDORF, O. Epigenetic diversity increases the productivity and stability of plant populations. **Nature Communications**, v.4, 2013.

LEI, C. P.; JIUN, K. S.; CHOO, C. S.; SINGH, R. Analysis of tissue culture-derived regenerants using methylation sensitive AFLP. **Asia Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology**, v. 14 (2), p.47-55, 2006.

LE MOS, E. G. M.; STRADIOTTO, N. R. **Bioenergia – Desenvolvimento, Pesquisa e Inovação**. 1.ed. São Paulo: Editora Cultura Acadêmica, 2012, 1072 p.

LI, Y.; SHAN, X.; LIU, X.; HU, L.; GUO, W.; LIU, B. Utility of methylation-sensitive amplified polymorphism (MSAP) marker for detection DNA methylation polymorphism and epigenetic population structure in a wild barley species (*Hordeum brevisubulatum*). **The Ecological Society of Japan**, v. 23, p. 927-930, 2008.

LIMA, M. L. A.; GARCIA, A. A. F.; OLIVEIRA, K. M.; MATSUOKA, S.; ARIZONO, H.; SOUZA JR, C. L.; SOUZA, A. P. Analysis of genetic similarity detected by AFLP and coefficient of parentage among genotypes of sugarcane (*Saccharum* spp.). **Theoretical Applied Genetics**, v. 104, p. 30-38, 2002.

LIU, X. L.; LI, X. J.; XU, C. H.; LIN, X. Q.; DENG, Z. H. Genetic Diversity of populations of *Saccharum spontaneum* with different ploidy levels using SSR molecular markers. **Sugar Tech**, v. 18, n. 4, p. 365-372, 2016.

LU, Y.H; D'HONT, A.; WALKER, D.I.T.; RAO, P.S.; FELDMANN, P.; GLASZMANN, J.C. Relationships among ancestral species of sugarcane revealed with RFLP using single copy maize nuclear probes. **Euphytica**, 78, p. 7–18, 1994.

LUO, D.; CARPENTER, R.; VINCENT, C.; COPSEY, L.; COEN, E. Origin of floral asymmetry in *Antirrhinum*. **Nature**, v. 383, p.794-799, 1996.

MA, K.; SONG, Y.; YANG, X.; ZHANG, Z.; LI, B.; ZHANG, D. Photosynthetic response to genome methylation affects the growth of Chinese white poplar. **Tree Genetics and Genomes**, v. 8, p. 1407–1421, 2012.

MA, K.; SONG, Y.; YANG, X.; ZHANG, Z.; ZHANG, D. Variation in genomic methylation in natural populations of Chinese white poplar. **PLOS ONE**, v. 8, n. 5, 9 p., 2013.

MANHÃES, C. M. C.; GARCIA, R. F.; FRANCELINO, F. M. A.; FRANCELINO, H. DE O.; COELHO, F. C. Fatores que afetam a brotação e o perfilhamento da cana-de-açúcar. **Vértices**, Campos dos Goytacazes, v.17, n.1, p.163-181, 2015.

MATSUOKA, S.; BRESSIANI, J.; MACCHERONI, W.; FOUTO, I. Bioenergia de Cana. In: SANTOS, F.; BORÉM, A.; CALDAS, C. (Eds.). **Cana-de-açúcar- Bioenergia, açúcar e etanol: tecnologias e perspectivas**. 2ª Ed. Viçosa: UFV, 2012. cap. 20, p. 547-577.

MATSUOKA, S.; KENNEDY, A.J.; SANTOS, E. G. D. DOS; TOMAZELA, A. L.; RUBIO, L. C. S. Energy cane: its concept, development, characteristics, and prospects. **Advances in Botany**, 2014.

MING, R.; MOORE, P.H.; D'HONT, A.; GLASZMANN, J.C.; TEW, T.L.; MIRKOV, T.E.; DA SILVA, J.; JIFON, J.; RAI, M.; SCHELL, R.J.; BRUMBLEY, S.M.; LAKSHMANAN, P.; COMSTOCK, J.C.; PATERSON, A.H. Sugarcane Improvement through Breeding and Biotechnology. In: JANICK, J. **Plant breeding reviews**. New York, John Wiley & Sons, 2006. cap. 2, p.15-118.

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

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

PANJE, R.; BABU, C. Studies in *Saccharum spontaneum* distribution and geographical association of chromosome numbers. **Cytologia**, v. 25, p. 152–172, 1960.

PÉREZ-FIGUEROA, A. msap: a tool for the statistical analysis of methylation-sensitive amplified polymorphism data. **Molecular Ecology Resources**, v. 13, p. 522-527, 2013. Disponível em: <doi:10.1111/1755-0998.12064>.

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

PIGLIUCCI, M.; MURREN, C. J.; SCHLICHTING, C. D. Phenotypic plasticity and evolution by genetic assimilation. **The Journal of Experimental Biology**, v. 209, p. 2362-2367, 2006.

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

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

QUE, Y.; PAN, Y.; LU, Y.; YANG, C.; YANG, Y.; HUANG, N.; XU, L. Genetic analysis of diversity within a Chinese local sugarcane germplasm based on start codon targeted polymorphism. **Biomed Research International**, 2014.

RAJ, P.; SELVI, A.; PRATHIMA, P. T.; NAIR, N. V. Analysis of Genetic Diversity of *Saccharum* Complex Using Chloroplast Microsatellite Markers. **Sugar Tech**, v. 18, n.2, p. 141-148, 2016.

ROACH, B.T. Origin and improvement of the genetic base of sugarcane. **Proceedings of the Australian Society of Sugar Cane Technology**, p. 34–47, 1989.

SÁEZ-LAGUNA, E.; GUEVARA, M-A.; DÍAZ, L-M.; SÁNCHEZ-GÓMEZ, D.; COLLADA, C.; ARANDA, I.; CERVERA, M-T. Epigenetic Variability in the Genetically Uniform Forest Tree Species *Pinus pinea* L. **PLOS ONE**, v. 9, n. 8, 2014.

SAITOU, N.; NEI, M. The Neighbor-joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees, **Molecular Biological Evolution**, v. 4, n. 4, p. 406-425, 1987.

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

SCHÖNSWETTER, P.; PAUN, O.; TRIBSCH, A.; NIKLFELD, H. Out of the Alps: colonization of Northern Europe by East Alpine populations of the Glacier Buttercup *Ranunculus glacialis* L. (Ranunculaceae). **Molecular Ecology**, v. 12, p. 3373-3381, 2003. Disponível em: <doi: 10.1046/j.1365-294X.2003.01984.x>.

SCHULZ, B.; ECKSTEIN, R. L.; DURKA, W. Epigenetic variation reflects dynamic habitat conditions in a rare floodplain herb. **Molecular Ecology**, v. 23, p. 3523-3537, 2014.

SCHULZ, B.; ECKSTEIN, R. L.; DURKA, W. Scoring and analysis of methylation-sensitive amplification polymorphisms for epigenetic population studies. **Molecular Ecology Resources**, v. 13, p. 642-653, 2013.

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

SHAH, A.H.; RASHID, N.; HAIDER, M.S.; SALEEM, F.; TAHIR, M.; IQBAL, J. An efficient short and cost effective regeneration system for transformation studies of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). **Pak. J. Bot.**, p.609-614, 2009.

SINGH, P.; SINGH, S. P.; TIWARI, A. K.; SHARMA, B. L. Genetic diversity of sugarcane hybrid cultivars by RAPD markers. **3 Biotech**, v.7, n. 3, 2017.

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. 115-124, 2010.

SONG, Q.; CHEN, Z. J. Epigenetic and developmental regulation in plant polyploids. **Current Opinion Plant Biology**, v. 24, p. 101-109, 2015.

SUO, Y.; DONG, C.; KANG, X. Inheritance and variation of cytosine methylation in three populus allotriploid populations with different heterozygosity. **PLOS ONE**, v. 10, n. 4, p. 1-12, 2015.

TANG, W. Y.; HO, S. M. Epigenetic reprogramming and imprinting in origins of disease. **Rev. Endocr. Metab. Disord.**, v.8, n.2, p.173-82, 2007.

VALLADARES, F.; GIANOLI, E.; GÓMEZ, J. M. Ecological limits to plant phenotypic plasticity. **New Phytologist**, Oxford, v. 176, p. 749-763, 2007.

VENETSKY, A.; LEVY-ZAMIR, A.; KHASDAN, V.; DOMB, K.; KASHKUSH, K. Structure and extent of DNA methylation-based epigenetic variation in wild emmer wheat (*T. turgidum* ssp. *dicoccoides*) populations. **BMC Plant Biology**, v. 15, 2015.

VOGT, G. Facilitation of environmental adaptation and evolution by epigenetic phenotype variation: insights from clonal, invasive, polyploid, and domesticated animals. **Environmental Epigenetics**, v. 3, n. 1, 2017.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; VAN DE LEE, T.; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, v. 23, n. 21, p. 4407-4414, 1995.

WEIGEL, D.; COLOT, V. Epialleles in plant evolution. **Genome Biology**, v.13, 2012.

WRIGHT, S. **Evolution and Genetics of Populations: Variability within and among Natural Populations**. Chicago: University of Chicago Press, 1978, 590 p.

ZHANG, M.; ZHENG, X.; YU, A.; XU, J.; ZHOU, H. Molecular marker application in sugarcane. **Sugar Tech**, v.6, n.4, p.251-259, 2004.

ZHANG, Y. Y.; FISCHER, M.; COLOT, V.; BOSSDORF, O. Epigenetic variation creates potential for evolution of plant phenotypic plasticity. **New Phytologist**, v. 197, p. 314-322, 2013.