UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

CARACTERIZAÇÃO DE ACESSOS DO "COMPLEXO *Saccharum*" E DESENVOLVIMENTO DE UMA COLEÇÃO NUCLEAR COM BASE EM MARCADORES MOLECULARES E ATRIBUTOS DE QUALIDADE

Renato Maldigamm Scorsolini Marchini

Biotecnologista

2019

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

CARACTERIZAÇÃO DE ACESSOS DO "COMPLEXO *Saccharum*" E DESENVOLVIMENTO DE UMA COLEÇÃO NUCLEAR COM BASE EM MARCADORES MOLECULARES E ATRIBUTOS DE QUALIDADE

Renato Maldigamm Scorsolini Marchini

Orientadora: Profa. Dra. Luciana Rossini Pinto
Coorientador: Dr. Mauro Alexandre Xavier

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

2019

M317c

Marchini, Renato Maldigamm Scorsolini

Caracterização de acessos do "Complexo Saccharum" e desenvolvimento de uma coleção nuclear com base em marcadores moleculares e atributos de qualidade / Renato Maldigamm Scorsolini Marchini. -- Jaboticabal, 2019

77 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientadora: Luciana Rossini Pinto

Coorientador: Mauro Alexandre Xavier

1. Saccharum spp.. 2. Cana-energia. 3. Variabilidade genética. 4. Coleção nuclear. 5. Banco de germoplasma. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: CARACTERIZAÇÃO DE ACESSOS DO "COMPLEXO Saccharum" E DESENVOLVIMENTO DE UMA COLEÇÃO NUCLEAR COM BASE EM MARCADORES MOLECULARES E ATRIBUTOS DE QUALIDADE

AUTOR: RENATO MALDIGAMM SCORSOLINI MARCHINI
ORIENTADORA: LUCIANA ROSSINI PINTO
COORIENTADOR: MAURO ALEXANDRE XAVIER

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

Pesquisadora Dra. LUCIANA ROSSINI PINTO
IAC - Centro de Cana / Ribeirão Preto/SP

Prof. Dr. MARCOS GUIMARÃES DE ANDRADE LANDELL
Centro de Cana-IAC / Ribeirão Preto/SP

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

Jaboticabal, 14 de junho de 2019

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Renato Maldigamm Scorsolini Marchini, nascido em 28 de setembro de 1992, em Santa Rita do Passa Quatro, SP, Brasil, concluiu a graduação no ano de 2016 em bacharelado em Biotecnologia, pela UFSCar – Universidade Federal de São Carlos – Centro de Ciências Agrárias. Desde o início da graduação, envolveu-se em estágios relacionados ao melhoramento genético de plantas, especialmente, cana-de-açúcar. Vivenciou atividades no campo do melhoramento genético convencional e biotecnologia. Em 2017, ingressou no curso de Mestrado em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas), pela instituição UNESP – Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Campus de Jaboticabal, sendo bolsista CNPQ (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico). Desenvolveu seu projeto no Laboratório de Biotecnologia do Centro de Cana do IAC sob orientação da Profa. Dra. Luciana Rossini Pinto.

EPÍGRAFE

“ Importante não é ver o que ninguém nunca viu, mas sim, pensar o que ninguém nunca pensou sobre algo que todo mundo vê."

Arthur Schopenhauer

“A beleza salvará o mundo”

Fiódor Dostoiévski

Dedico este trabalho à minha mãe, que nunca mediu esforços para minha felicidade, e sempre me inspirou com sua força, garra e amor, sendo o meu maior exemplo. Você é o que tenho de mais precioso. Se hoje navego mar afora, é porque sei que você é meu cais.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida

A toda minha família, especialmente, aos meus irmãos Antônio Augusto (Guto), Mario Sergio (Serginho), Nelson, e minha mãe, por serem meu porto seguro. Eles são o que tenho de mais valioso na vida.

Ao meu avô Nelson por ser meu espelho. Pela oportunidade de ser o seu neto (preferido). Pelo presente que é tê-lo no meu dia a dia.

A todos os professores que tive, e que me ensinaram muito mais que conhecimentos técnicos, mas foram a base da minha educação.

A todos os meus amigos, que felizmente, são muitos. Amigos são tesouros no meio do caminho, e cada um teve uma parte essencial nesta jornada, sempre deixando a certeza de que “tudo vai ficar bem”.

À Profa. Dra. Luciana Rossini Pinto, por ser um grande exemplo de pesquisadora, me ensinando e auxiliando sempre que precisei. Pela amizade, paciência, e todo o conhecimento compartilhado.

A toda a equipe do Laboratório de Biotecnologia do IAC pela amizade e auxílio prestado na execução deste projeto: Thaís, Maicon e Juliana. A todos os amigos do IAC que tive a honra de conviver nesses anos, e tornaram a jornada mais leve e prazerosa. Muito obrigado pela convivência, conversas, risadas e toda a ajuda prestada.

À Maria Natalia (Nat), pela valiosa amizade que construí, por toda a ajuda prestada e valiosas sugestões referentes a este projeto.

À Gleyce, pela também valiosa amizade, e ajuda na execução e organização deste trabalho.

Ao João Ricardo Vieira Manechini por ter cedido parte de seus dados, por toda a ajuda prestada e paciência dispensada para me auxiliar na execução deste trabalho, sempre disponível para sanar minhas dúvidas. Muito obrigado!

Ao Marcel Fernandes que compôs a Banca de qualificação, pelas valiosas sugestões para o aprimoramento deste trabalho.

Aos membros da Banca de defesa Dr. Marcos Guimarães de Andrade Landell e Dr. Dilermando Perecin pela disponibilidade e preciosas sugestões para aprimoramento deste trabalho.

Ao Dr. José Antônio Bressiani pela disponibilização das variedades Vertix (VX) e dados fenotípicos.

À UFSCar – CCA, onde fiz minha graduação, e amadureci pessoal e profissionalmente, especialmente ao PMGCA, onde tive a oportunidade de fazer estágio e aprender valiosas lições, e a todos os amigos que lá fiz e levo para a vida.

Ao Instituto Agronômico de Campinas- IAC, pela oportunidade de desenvolver meu projeto em suas dependências.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CNPQ pela concessão da bolsa de estudo.

MUITO OBRIGADO!

SUMÁRIO Página

CAPÍTULO 1 – Considerações gerais 1

1. Introdução 1

2. Revisão de Literatura 4

2.1. Espécies do gênero *Saccharum* 4

2.2. Cana-energia 6

2.3. Marcadores moleculares do tipo microssatélite e acesso à diversidade genética 10

2.4. Panorama de energias renováveis no Brasil 15

2.5. Biomassa para produção de energia 17

3. Referências Bibliográficas 21

CAPÍTULO 2 - Caracterização e análise da estrutura genética de acessos de *S. spontaneum* e cultivares de cana-energia, e obtenção de uma coleção nuclear de *S. spontaneum.* 27

1. Introdução 27

2. Materiais e métodos 29

2.1. Material vegetal 29

2.2. Extração de DNA 32

2.3. Amplificação por PCR 32

2.4. Análise de dados 33

2.5. Cálculo do PIC, frequência alélica e diversidade gênica 34

2.6. Análise da diversidade e estrutura genética 34

2.7. Análise filogenética 35

2.8. Obtenção da coleção nuclear 35

3. Resultados 35

3.1. Análise de polimorfismo dos *SSR* 35

3.2. Análise da estrutura genética 36
3.3. Dissimilaridade e análise filogenética 39
3.4. Coleção nuclear 40
4. Discussão 44
5. Referências Bibliográficas: 49
CAPÍTULO III: Avaliação dos atributos tecnológicos de acessos do Complexo *Saccharum* e obtenção de uma coleção nuclear 52
1. Introdução 52
2. Material e métodos 54
2.1. Material vegetal 54
2.2. Análise tecnológica 57
2.3. Estatística descritiva 57
2.4. Obtenção de uma coleção nuclear 58
3. Resultados 58
3.1. Distribuição dos dados 58
3.2. Dispersão e correlação entre atributos tecnológicos 62
3.3. Análise de componentes principais 64
3.4. Coleção nuclear 65
4. Discussão 68
4.1. Distribuição dos dados 68
4.2. Dispersão dos dados e correlação 71
4.3. Obtenção da coleção nuclear 72
5. Referências Bibliográficas 75

CARACTERIZAÇÃO DE ACESSOS DO "COMPLEXO *Saccharum*" E DESENVOLVIMENTO DE UMA COLEÇÃO NUCLEAR COM BASE EM MARCADORES MOLECULARES E ATRIBUTOS DE QUALIDADE

RESUMO – No cenário atual, é crescente a busca por novas fontes de energia renovável, sendo a cana-de-açúcar uma das culturas de destaque, não apenas pela produção de açúcar e etanol como também pela co-geração de energia elétrica. Esforços no sentido de utilizar a cana integralmente vêm sendo realizados nos últimos anos pelos Programas de Melhoramento Genético de Cana-de-Açúcar no Brasil, que têm focado no desenvolvimento das chamadas "cana-energia", as quais apresentam maior quantidade de fibra que as cultivares convencionais. Tanto para a geração de novas cultivares convencionais, como de cana-energia, é necessário que haja conhecimento da variabilidade genética e fenotípica em um banco de germoplasma para uma maior eficiência no uso dos recursos genéticos disponíveis. O Programa de Melhoramento Genético de Cana-de-Açúcar do Instituto Agronômico (IAC) importou diversos acessos do Complexo *Saccharum*, principalmente acessos de *S. spontaneum* para compor a sua coleção de germoplasma básico. No presente trabalho, pretendeu-se avaliar a diversidade genética, através de 12 pares de *primers* microssatélites (SSR - *Single Sequence Repeats)* de um grupo de genótipos compostos por acessos de *S. spontaneum*, *S. officinarum,* cultivares de cana-energia e cultivares comerciais. Os resultados mostraram a separação de todos os genótipos em dois grupos principais: Grupo 1 formado por acessos de *S. spontaneum* e Grupo 2 formado pelo restante dos acessos, com 7,31% ($P<0,001$) da variabilidade total distribuída entre os grupos. Na análise filogenética, os genótipos foram agrupados de acordo com suas genealogias, formando subgrupos para cada espécie. A dissimilaridade média entre os indivíduos foi de 0,73. Uma coleção nuclear com base nos dados moleculares, contemplando aproximadamente 25% do total de acessos foi gerada. Também foram analisados acessos de diferentes espécies do Complexo *Saccharum* quanto a seus atributos de qualidade: Brix, Pol da cana corrigido, Teor de Fibra, Porcentagem de açúcares redutores e Pureza aparente do caldo. A variável com maior coeficiente de variação (0,54) foi Pol da cana corrigido (PCC). A maior correlação positiva (0,96) foi obtida entre as variáveis Brix e Pol da cana corrigido, e a maior correlação negativa (-0,72) entre Fibra e Pol da cana corrigido. Uma coleção nuclear baseada nos dados quantitativos dos atributos de qualidade foi elaborada contemplando 20% do total de acessos avaliados. Os resultados obtidos serão incorporados no Banco de Perfil Molecular do Programa Cana-IAC e contribuirão para a gestão e exploração do germoplasma básico e o desenvolvimento de cultivares de cana-energia e cultivares comerciais.

Palavras-chave: atributos tecnológicos, cana-energia, coleção nuclear, microssatélites, *Saccharum* spp., variabilidade genética

CHARACTERIZATION OF ACCESSIONS FROM THE "*Saccharum* Complex" AND DEVELOPMENT OF A CORE COLLECTION BASED ON MOLECULAR MARKERS AND QUALITY ATTRIBUTES

ABSTRACT – In the current scenario, the search for new sources of renewable energy is increasing, and sugarcane is one of the most important crops not only for the production of sugar and ethanol but also for electric energy co-generation. Efforts to use whole sugarcane have been carried out in recent years by the Sugarcane Breeding Programs in Brazil, which have focused on the development of "energy cane", which present a greater amount of fiber than the conventional cultivars. In order to obtain new conventional and energy-cane cultivars, it is important to measure the genetic and phenotipic variability of a germplasm bank, to promote a greater efficiency in the use of available genetic resources. The Sugarcane Breeding Program of the Agronomic Institute (IAC) has imported accessions from the *Saccharum* Complex to compose its basic germplasm collection. The present work aimed to evaluate the genetic diversity by using 12 microsatellite primers pairs (SSR - Single Sequence Repeats) of a group of accessions from *S. spontaneum*, *S. officinarum* energy-cane cultivars and commercial cultivars. The results showed the division of all accessions in two main groups: Group 1 formed by accessions from *S. spontaneum,* and Group 2 by the remaining accessions, with 7.31% ($P < 0.001$) of the total variability found between these groups. In the phylogenetic analysis, the genotypes were grouped according to their genealogies, forming subgroups for each species. The average pair-wise dissimilarity was 0.73. A core collection based on molecular data, covering approximately 25% of the entire collection, was generated. Accessions from different species of the *Saccharum* Complex were also analyzed according to their technological attributes: Brix (soluble solids content), Corrected Cane Pol, Fiber Content, Percentage of reducing sugars and Apparent Purity of the juice. The variable with the highest coefficient of variation (0.54) was Corrected Cane Pol (PCC). The highest positive correlation (0.96) was obtained between Brix and Corrected Cane Pol, and de the highest negative correlation (-0,72) between Fiber content and Corrected Cane Pol. A core collection based on the quantitative data of the quality attributes was also obtained. The core collection included 20% of accessions from the entire collection. The results here obtained will be incorporated into the Molecular Profiling Bank of the Sugarcane Breeding Program -IAC and will contribute to the management and exploitation of basic germplasm and the development of both energy-cane cultivars and commercial cultivars.

Keywords: technological attributes, energy-cane, core collection, microsatellites, *Saccharum* spp., genetic variability

CAPÍTULO 1 – Considerações gerais

1. Introdução

No cenário atual, a busca por possíveis fontes para geração de energia renovável, que além de sustentáveis, possuam boa eficiência energética, é cada vez maior. Dentre as energias renováveis, a proveniente da biomassa vem ganhando destaque. A biomassa lignocelulósica é altamente sustentável e apresenta grande potencial para geração de energia, produção de combustíveis e diversos produtos químicos (Santos et al., 2012), além de apresentar muitas vantagens quando proveniente de resíduos de um determinado processo, agregando valor e garantindo rentabilidade. Neste âmbito se destaca a cana-de-açúcar, que gera uma grande quantidade de resíduos ricos em biomassa, passíveis de serem utilizados para a produção de energia.

A cana-de-açúcar figura entre as principais culturas de destaque econômico no mundo, especialmente em países de clima tropical e subtropical, pela produção de açúcar etanol, sendo o Brasil o maior produtor desta cultura. Na safra de 2018/2019 estimou-se uma produção de 620,44 milhões de toneladas de cana-de-açúcar, a qual geraram 29,04 milhões de toneladas de açúcar e 33,14 bilhões de litros de etanol (CONAB, 2019).

Considerando as fontes de biomassa utilizadas na geração de bioeletricidade, a biomassa da cana contribui com 76%, representando a terceira fonte de geração mais importante da matriz elétrica brasileira em termos de capacidade instalada, superada apenas pelas fontes hídrica e termelétricas de gás natural (UNICA, 2017). Tanto o setor público como o privado têm investido em tecnologias para o uso da biomassa da cana-de-açúcar, especialmente no desenvolvimento de etanol de segunda geração ou celulósico.

Desde o início, o melhoramento genético da cana-de-açúcar foi direcionado para o desenvolvimento de cultivares ricas em sacarose, visando, primeiramente, a produção de açúcar e, em segundo plano, etanol. Assim, por ser considerado um grande reservatório de genes que contribuem para o aumento da sacarose, a espécie *S. officinarum* foi a mais explorada nesse

sentido, e por isso, as cultivares comerciais possuem maior parcela genômica desta espécie, e menor de *S. spontaneum*, espécie utilizada nas primeiras hibridações interespecíficas para aumento da rusticidade e resistência a doenças (Irvine, 1999).

Com o reconhecimento da possibilidade de co-geração de energia a partir da biomassa da cana-de-açúcar, como o bagaço, ponteiras e palha, os Programas de Melhoramento Genético de Cana-de-Açúcar iniciaram o desenvolvimento de um novo perfil de cultivares denominado cana-energia, uma cana mais rica na fração lignocelulósica. A cana-de-açúcar comumente plantada possui em torno de 13% de sacarose, e 12% de fibra (Tew e Cobill, 2008). A cana-energia pode manter o teor de sacarose, porém, a quantidade de fibra deve ser maior, e ocorre de acordo com o uso da mesma, aumentando, por exemplo, a fração de lignina se o objetivo for a produção de energia elétrica (Carvalho-Netto et al., 2014). O teor de fibra pode chegar à 30%, (Tew e Cobill, 2008) e pode ser empregado para a geração de biocombustíveis, como o etanol de segunda geração, e produção de diversos bioprodutos.

Nesse contexto, a espécie alvo de exploração é *S. spontaneum,* a qual se destaca, pois além de possuir resistência à diversas doenças, rusticidade, alta taxa de perfilhamento, e boa capacidade de rebrota, é a espécie que possui maior teor de fibra do gênero *Saccharum* (Silva, 2017). Esse fato torna imprescindível o conhecimento e caracterização de sua diversidade genética, visando introgressão de genes e hibridação com as cultivares modernas para obtenção da cana-energia.

O Programa de Melhoramento Genético para Biomassa do Instituto Agronômico de Campinas (IAC), iniciou a partir de 2010 a importação de acessos selvagens de *Saccharum* e outros gêneros de importância como *Erianthus* provenientes das coleções de germoplasma da *World Sugarcane and Related Grasses Collection* do USDA/ARS, e da *Sugar Research Australia* (Meringa, Austrália). Até o presente momento foram importados e quarentenados cerca de 400 acessos, os quais estão sendo caracterizados para compor uma Coleção Pública de Germoplasma representativa do Complexo *Saccharum.* O perfil molecular de uma parte destes acessos já foi caracterizado via marcadores moleculares e depositado no banco de perfil molecular do Programa Cana- IAC

com o intuito de auxiliar na gestão do banco de germoplasma. Dentre as metas a serem cumpridas serão caracterizados o perfil molecular de acessos do Complexo *Saccharum* constituídos, em sua maioria, por acessos de *S. spontaneum*.

Diante do exposto e considerando a importância da caracterização de acessos de *S. spontaneum*, tanto para o desenvolvimento de cultivares para biomassa como para a ampliação do *pool* gênico dos programas de melhoramento de cana, o presente estudo teve como objetivo caracterizar, via marcadores moleculares do tipo microssatélites, novos acessos de *S. spontaneum*, recém quarentenados, referentes a última importação de germoplasma realizada pelo Programa de Melhoramento Genético de Cana-de-Açúcar do IAC, como também de cultivares de cana-energia. Além disso, buscou-se verificar a contribuição destes novos acessos na diversidade genética da coleção pré-existente de *S. spontaneum* e a distribuição desta nova diversidade com relação a cultivares comerciais, cana-energia e uma coleção nuclear de *S. officinarum*. Com a inclusão destes novos acessos no banco de perfil molecular foi estabelecida uma coleção nuclear para *S. spontaneum.* Uma coleção nuclear também foi estabelecida com base nos atributos tecnológicos disponíveis para alguns acessos do Complexo *Saccharum* aqui investigados**.**

2. Revisão de Literatura

2.1. Espécies do gênero *Saccharum*

A cana-de-açúcar é uma gramínea poliplóide, pertencente à sub-tribo *Saccharinae* da tripo Andropogenae. O pool gênico estendido do gênero é conhecido como o "Complexo *Saccharum*" (Mukherjee, 1957; Daniels e Roach, 1987), e compreende espécies de gêneros correlatos como *Erianthus, Sclerostachya, Miscanthus e Narenga,* capazes de se intercruzarem entre si. Indivíduos pertencentes ao Complexo *Saccharum* surgiram através de eventos de poliploidização e hibridação. Há controvérsias acerca do centro de origem do gênero *Saccharum,* porém Índia, Indonésia e Papua Nova Guiné são os prováveis locais de origem.

O gênero *Saccharum* é constituído por seis espécies principais: *S. spontaneum*, e *S. robustum*, as espécies selvagens, *S. officinarum*, a espécie mais rica em sacarose, *S. barberi*, *S. sinense* e *S. edule* (Ming et al., 2006). Os centros onde mais se encontram diversidade de algumas espécies são Nova Guiné, para *S. officinarum* e *S. robustum*; China, para *S. sinense*; e norte da Índia, para *S. barberi* e *S. spontaneum* (Figueiredo, 2010).

No início, apenas a “cana nobre” (*S. officinarum*) era explorada por seu alto teor de açúcar, e os primeiros clones de cana-de-açúcar pertenciam à esta espécie. Entretanto, houve a necessidade de aumentar a resistência às doenças, então, esta espécie foi intercruzada com *S. spontaneum* por melhoristas da Índia e Java no início do século passado, dando origem aos primeiros híbridos interespecíficos de cana-de-açúcar, que são a base das cultivares modernas (Nair et al., 2006), que possuem aproximadamente 85% da parcela genômica provinda de *S. officinarum* e 15% de S*. spontaneum* (D’Hont et al., 1998).

A espécie *S. spontaneum* é a mais primitiva com ampla distribuição em regiões tropicais e subtropicais. Somente na Índia, são conhecidos mais de 300 tipos desta espécie, sendo que são encontradas nos ambientes mais contrastantes, como desertos e regiões de encharcamento, o que torna a espécie com maior adaptabilidade do gênero (Govindaraj et al., 2014). Sua evolução em ambientes contrastantes gerou um largo *pool* genético, adaptado

aos mais diversos ambientes, incluindo resistência a muitas doenças da cana-de-açúcar (Matsuoka et al., 2014). Tipicamente, tem colmos finos, baixo conteúdo de sacarose, e é a espécie que mais pode contribuir para introgressão de resistência a doenças, pragas, estresses abióticos e, principalmente, incremento de fibra e aumento da produtividade, por sua alta taxa de perfilhamento e rebrota (Ming et al., 2006). *S. spontaneum* possui vigoroso rizoma, o que torna a espécie extremamente invasiva, por isso, em bancos de germoplasma, deve ser cultivada em vasos (Silva et al., 2018; Tai e Miller, 2001).

Já foram relatados mais de 30 citótipos de *S. spontaneum* contendo número cromossômico variando entre 2n = 40-128 (Nair et al., 2006). Técnicas moleculares mostraram que a espécie *S. spontaneum* é distinta das outras espécies também no DNA citoplasmático, e análises de agrupamento confirmaram a diferença (Irvine, 1999). Zhang et al. (2004) também relataram em estudos de classificação do gênero *Saccharum* que *S. spontaneum* é geneticamente distinta das outras quatro espécies *S. robustum*, *S. sinense*, *S. officinarum* e *S. barberi,* e em análises filogenéticas, a espécie tende a formar um grupo separado das outras.

Saccharum edule se caracteriza por possuir inflorescência abortiva, ausência de açúcar, e é tradicionalmente cultivada de Nova Guiné à Fiji (Ming et al., 2006). Ao contrário dos outros membros que constituem o gênero *Saccharum*, não há dados suficientes para analisar a diversidade genética e origem dessa espécie (Henry e Kole, 2010). Por não apresentar características desejáveis, não é utilizada em programas de melhoramento. Acredita-se que esta espécie se originou a partir da espécie selvagem *S. robustum* (Daniels e Roach, 1987).

De acordo com a técnica de hibridação *in situ*, *S. barberi* e *S. sinense* são derivadas da hibridação interespecífica entre S. *officinarum* e *S. spontaneum* (D'Hont et al., 2002). Têm alto teor de açúcar e muitos clones são tolerantes a doenças e estresses ambientais. Entretanto, o uso dessas espécies no melhoramento é restrito devido à sua baixa floração e fertilidade (Screenivasan et al., 1987).

A espécie cultivada *S. officinarum* (2n = 70 a 140) é cogitada ter sido derivada de *S. robustum* (Irvine, 1999). Por apresentar alto teor de sacarose, as

cultivares modernas são principalmente derivadas dessa espécie através de ciclos de retrocruzamento com a mesma, processo chamado de nobilização, que explica a maior contribuição de *S. officinarum* nas cultivares modernas (Roach, 1971). Após a redescoberta de *S. officinarum* no século XVIII, a indústria de açúcar rapidamente se espalhou por áreas tropicais e subtropicais, e apenas clones desta espécie eram propagados vegetativamente (Heinz et al., 1994).

S. robustum apresenta de pequenos a grandes colmos, duros e lenhosos, e baixo teor de sacarose (Ming et al., 2006). Uma das hipóteses para a sua origem é a de que surgiu a partir de hibridações naturais de *S. spontaneum* (2n=80) com outros gêneros (possivelmente *Erianthus* e *Miscanthus*) (Daniels et al., 1975).

2.2. Cana-energia

A cana-de-açúcar é uma cultura de importância industrial em regiões de clima tropical e sub-tropical, em mais de 100 países no mundo (Costa et al., 2011). Estima-se que seja responsável por aproximadamente 75% da produção mundial de açúcar. Além do açúcar, seu potencial é explorado para produção de energia elétrica e combustível verde (etanol) em países como Brasil e Estados Unidos (Sanghera et al., 2015). O Brasil produziu aproximadamente 33,58 bilhões de litros na safra de 2018/2019, sendo o segundo maior produtor mundial (CONAB, 2019).

É exclusivamente para atender a demanda energética que um novo perfil de cana-de-açúcar foi desenvolvido: a cana-energia. Diferente da cana-de-açúcar convencional, que desde as primeiras hibridações buscou-se o incremento no teor de sacarose, a cana-energia visa uma maior quantidade de biomassa (Matsuoka et al., 2014).

A cana-de-açúcar convencional possui apenas cerca de 12% de fibras, característica que pode alcançar até 30% na cana-energia (Tew e Cobill, 2008). Este incremento proposital no teor de fibra permite dar utilidade aos resíduos da cana, como bagaço, ponteira e palha, agregando valor ao processo. Na cana-de-açúcar convencional, a cada tonelada de cana moída, sobram em média 240 kg de bagaço (Ensinas et al., 2007), e aproximadamente 204 kg de palha e

pontas. Por serem ricos em lignina, celulose e hemicelulose, esses resíduos podem ser reaproveitados de diversas formas (Chohfi et al., 2009). A bioeletricidade, por exemplo, energia elétrica gerada a partir do processo de cogeração pela queima do bagaço, e a geração de etanol de segunda geração, onde o etanol é gerado a partir da hidrólise dos componentes lignocelulósicos, são os dois processos sustentáveis ambiental e economicamente mais consolidados, porém segundo Rodrigues (2011), muitos produtos químicos, biomateriais e biocombustíveis podem ser gerados a partir da biomassa, garantindo menores danos ambientais.

Como o intuito da cana-energia é uma maior quantidade de fibra, deve-se buscar a introgressão desta característica a partir de espécies selvagens, ao passo que os híbridos comerciais e pré-comerciais, utilizados no processo de hibridação, não possuem esta característica. A espécie *S. spontaneum* é considerada a maior fonte de genes para este fim (Silva, 2017). Hibridações com genótipos ricos em fibra e que apresentem um bom desempenho devem ser realizadas para que estas características sejam incorporadas nestas novas cultivares de cana.

Saccharum spontaneum apresenta baixo teor de açúcar, grande capacidade de rebrota, resistência a doenças, alta taxa de perfilhamento e colmos bem fibrosos (Silva et al., 2018), além de ser a espécie que possui maior diversidade do gênero *Saccharum.* Os primeiros cruzamentos com esta espécie, no início do século XX, com *S. officinarum*, ocorreram no intuito de contribuir com rusticidade e resistência a doenças e deram origem aos primeiros híbridos interespecíficos de cana-de-açúcar, os quais, após sucessivos retrocruzamentos com *S. officinarum* para recuperar o teor de açúcar, formaram a base das atuais cultivares comerciais (Ming et al., 2006).

Diferente do que ocorreu, neste processo chamado nobilização, na cana-energia busca-se a introgressão de genes de *S. spontaneum* apenas. Como proposto por Silva (2017), este processo inverso, visando maior incremento de biomassa poderia ser denominado de "Espontanização". Inicialmente, o termo cana-energia se referia à um sistema de gestão da cana-de-açúcar ou “*energy cane management*”, e não ao tipo de planta especificamente. Esse sistema visava solucionar a crise político-econômico em Porto Rico em 1970, na qual o

açúcar estava desvalorizado, vislumbrando a cana-de-açúcar como um todo, ou seja, não enxergando apenas o potencial de produção exclusivamente de açúcar, mas de sua máxima produção também de biomassa e toda sua utilidade no sentido energético (Matsuoka et al., 2014).

Embora naquela época este sistema não ter sido adotado, hoje em dia é percebido e cada vez mais reconhecido o real valor da biomassa da cana-de-açúcar por sua vasta utilidade. Desta forma, a produção de fibra em vez de apenas açúcar foi valorizada, assim, a cana-energia hoje se refere à um tipo específico de planta (Matsuoka et al., 2014).

Basicamente, existem dois tipos de cana-energia: Tipo I e Tipo II. O primeiro é mais parecido com a cana-de-açúcar convencional, visa manter o teor de sacarose em pelo menos 12-13% e aumentar o teor de fibra, já o segundo tipo, visa aumentar drasticamente o teor de fibra, podendo chegar à 30%, sem necessariamente aumentar o teor de sacarose (Tew e Cobill, 2008). Apesar da vastidão de opções que a fibra possui, o processamento de materiais muito fibrosos, especialmente no pré-tratamento e moagem em usinas ainda precisa ser adaptado (Carvalho-Netto et al., 2014), bem como tecnologias como a de produção de etanol de segunda geração precisam ser aprimoradas para que se utilize todo seu potencial, o que torna, atualmente, o Tipo I o mais viável.

No tocante a geração de híbridos de cana-energia Tipo I e Tipo II, em ambos os casos, geralmente, se utilizam cultivares comercias x *S. spontaneum* ou acessos de *S. officinarum* x *S. spontaneum* almejando genótipos transgressivos para as características de interesse (Matsuoka et al., 2014), onde híbridos transgressivos F1 são selecionados no caso do Tipo II, ou ainda retrocruzados com *S. spontaneum*, no tipo I, pois há evidências que na primeira geração os teores de fibra, perfilhamento e rebrota são maiores, reduzindo nas gerações subsequentes de cruzamento (Tew e Cobill, 2008).

Em relação à morfologia e fisiologia, a cana-energia se difere substancialmente da cana-de-açúcar convencional por possuir características exclusivas de *S. spontaneum:* colmos e folhas mais finos, maior perfilhamento por touceira, e um sistema profundo de raiz, com presença de rizoma. Esta última característica confere à cana-energia a capacidade de maior sequestro de carbono, maior resistência à pisoteio e tráfego de máquinas agrícolas, e

tolerância à diversos estresses abióticos, inclusive ambientes extremos e restritivos (Silva, 2017).

Esta capacidade da cana-energia de ser cultivada em áreas marginais é muito importante no que diz respeito ao cultivo de culturas agrícolas destinadas somente à produção de energia. Muito se discute sobre a disputa de terras para produção de alimentos ou energia, então esta característica torna a cana-energia ideal por poder ser cultivada em áreas marginais, ambientes restritos, não tomando lugar de culturas destinadas à produção de comida, e ainda, contribuindo com o meio-ambiente (Silva, 2017). Além disso, devido à sua rusticidade, demanda menor quantidade de defensivos agrícolas, o que também contribui para a preservação ambiental.

Outra característica da cana-energia relacionada ao hábito rizomatoso, que traz vantagem do cultivo desta, é que diferente da cana-de-açúcar convencional, a qual é exigente em água e nutrientes para uma maior produtividade, e possui determinada época de maturação/colheita, a cana-energia pode ser colhida o ano todo com menos exigência para manter a sua produtividade. A cana-de-açúcar convencional não possui a mesma rebrota em cana soca e cana planta, diferente da cana-energia, em que pode haver rebrota por até 8 ciclos de cana soca sem decréscimo significativo da produtividade (Matsuoka et al., 2014).

Dadas as considerações sobre a cana-energia e seu cultivo, é muito importante que se invista na divulgação científica e transferência de tecnologia, e mais que isso, que todas as áreas do setor sucroenergético sejam remodeladas para que, de fato, a sociedade se beneficie com as vantagens de seu cultivo. Apesar de algumas tecnologias não estarem totalmente consolidadas em níveis comerciais, como a produção de etanol de segunda geração, a bioletricidade já é uma realidade, e a geração de bioprodutos a partir da fibra também nas chamadas “biorrefinarias”.

A cana-energia tem muito a contribuir ambiental e economicamente, sendo que o primeiro passo é a existência da matéria-prima. O melhoramento genético é a ferramenta que desenvolve os genótipos de cana-energia que podem ser definidos de acordo com a diretriz requerida: maior ou menor teor de sacarose acompanhado de maior ou menor teor de fibra/biomassa. Os bancos

de germoplasma básico contam com uma gama de acessos de *S. spontaneum* que podem ser explorados para este intuito, tornando-os alvo de caracterização para a correta exploração.

2.3. Marcadores moleculares do tipo microssatélite e acesso à diversidade genética

Define-se como marcador qualquer atributo morfológico, bioquímico ou fisiológico que co-segregue com determinado gene de interesse (Ferreira e Grattapaglia, 1998). No melhoramento genético, a utilidade dos marcadores se dá principalmente no processo de identificação, seleção de genótipos e na hibridação, visando gerar genótipos superiores. Existem diversos tipos de marcadores em plantas, sendo que no início, apenas caracteres morfológicos eram utilizados, porém, possuem limitações, principalmente devido à influência ambiental exercida sobre eles (Santos et al., 2014). Assim, desde o advento da técnica dos marcadores moleculares, estes são os mais utilizados principalmente por serem neutros, e gerarem maior quantidade de informação genética/polimorfismo (Ferreira e Grattapaglia, 1998).

Existem diversos tipos de marcadores moleculares, e o uso de cada um varia de acordo com o objetivo de estudo. Os microssatélites ou *SSRs* (*simple sequence repeats*) são os mais utilizados em estudos de diversidade genética, principalmente por sua simplicidade: demandam pouca quantidade de DNA, possuem natureza multialélica e herança codominante, gerando grande quantidade de informação, além de possuírem alta reprodutibilidade (Oliveira et al., 2006).

Esses marcadores consistem em sequências de 1 a 6 nucleotídeos (motivo) repetidos em tandem (Jarne e Logada,1996), onde o polimorfismo é resultado da variação do número de repetições dos motivos entre os indivíduos que estão sendo analisados. O alto grau de variação alélica é oriundo de permuta desigual durante a meiose ou do deslize da DNA polimerase durante a duplicação do DNA (Morgante et al., 2002), e por conta da sua grande quantidade de polimorfismos são ideais para estudos de diversidade genética (Singh et al., 2014).

A obtenção dos microssatélites envolve a amplificação via PCR (*polymerase chain reaction*), de pequenas quantidades de DNA, utilizando-se *primers* específicos (geralmente de 20 a 25pb) para as regiões que flanqueiam os microssatélites. Nesse sentido, para se conseguir marcadores microssatélites, é necessário, primeiramente o desenvolvimento dos pares de *primers* específicos para a espécie em estudo (Faleiro, 2007). Uma grande vantagem desse tipo de marcador é a transferibilidade, na qual, os mesmos pares de *primers* podem ser usados para diferentes espécies do mesmo gênero. Esse fato se deve às regiões de microssatélites serem altamente conservadas (Oliveira et al., 2006). Selvi et al. 2003 utilizaram 34 pares de *primers* desenvolvidos para milho em cana-de-açúcar, e 14 deles geraram produtos de amplificação em cultivares comerciais, espécies do gênero *Saccharum* e de *Erianthus*, mostrando grande capacidade para discriminar as diferentes espécies, e para uso no *fingerprint* das cultivares comerciais com apenas dois pares de *primers*.

Os microssatélites podem sem obtidos via construção de bibliotecas genômicas ou busca em bancos de dados, como os de etiquetas de sequencias expressas ou EST (*Expressed sequence tags*). A primeira envolve um processo laborioso com o intuito de identificar e validar no genoma de estudo, possíveis microssatélites, já na segunda, são mais baratos e fáceis, derivados de sequencias originárias da região expressa do genoma, assim, possuem maior transferibilidade entre espécies (Singh et al., 2014).

Apesar dos microssatélites oriundos de bibliotecas genômicas, em geral, possuírem maior PIC (Conteúdo de Informação de Polimorfismo) e maior precisão em agrupar diferentes espécies (Parthiban al., 2018), em cana-de-açúcar, os *EST-SSR*s apresentam grande eficácia, principalmente por conta da elevada heterozigosidade, permitindo a execução de diversos estudos, como *fingerprint*, análises de agrupamento, testes de paternidade, entre outros (Pinto et al., 2004).

Tew et al. (2010) verificaram a capacidade de marcadores *SSR*s na identificação de paternidade em cruzamentos do tipo *polycross*, onde 7 pais diferentes foram analisados junto à progênie confirmando a capacidade de recuperação de informações de pedigree. Santos et al. (2014) também

confirmaram esta capacidade dos microssatélites em cruzamentos biparentais, analisando progênies oriundas de 4 cruzamentos diferentes via 3 pares de *primers* constatando que em um dos cruzamentos havia contaminação de pólen, ressaltando a importância do uso de microssatélites para este fim.

Diola et al. (2014) demonstraram o potencial de *EST-SSRs* em estudo de associação genótipo-fenótipo por desequilíbrio de ligação. Noventa e seis genótipos de cana-de-açúcar foram fenotipados e genotipados com marcadores *EST-SSRs* potencialmente relacionados às características de interesse. Cinco grupos foram obtidos de acordo com as características agronômicas e as funções dos *EST*s selecionados. O conjunto de marcadores escolhido apresentou PIC alto e alto poder de distinção entre os genótipos.

O estreitamento da base genética das atuais cultivares de cana-de-açúcar é muito discutido, principalmente devido ao fato de, no processo de melhoramento, os genitores serem cultivares comercias, ou clones superiores, geralmente aparentados. A fim de verificar o estreitamento da base genética das cultivares de açúcar, Crystian et al. (2018) utilizaram 4 pares de primers *SSR*s em diferentes cultivares provenientes de diferentes décadas do banco de germoplasma da Serra de Ouro. Através da técnica de regressão linear, os autores testaram se havia correlação entre o tempo e estreitamento da base genética, verificando uma menor similaridade genética nas últimas décadas, corroborando com o fato de que não existe estreitamento da base genética. Mesmo utilizando poucos marcadores foi suficiente para distinguir todas as cultivares analisadas, o que em cana-de-açúcar é comum, devido ao alto nível de poliploidia e aneuploidia.

Os microssatélites são os marcadores que mais contribuíram para compreensão e acesso da diversidade genética em cana-de-açúcar. Inúmeros estudos neste âmbito forneceram informações importantes. Liu et al. (2016) analisaram acessos da espécie *S. spontaneum*, espécie do gênero S*accharum* com a maior variabilidade genética e cromossômica. Acessos com 4 tipos de ploidia diferentes foram analisados através de 30 pares de *primers*. De acordo com os resultados, observaram que curiosamente octaplóides e decaplóides tiveram maior diversidade que nonaplóides e dodecaplóides. Essas informações são valiosas em programas de melhoramento genético.

Ali et al. (2019) analisaram a diversidade e estrutura genética de acessos pertencentes à 5 espécies do gênero *Saccharum*, gênero *Erianthus* e híbridos de *Saccharum*. Os acessos foram analisados por 21 pares de *primers* SSR que apresentaram alto polimorfismo, sendo que sete deles possuem alto potencial na identificação de acessos do gênero *Saccharum* e híbridos. O conjunto de marcadores foi capaz de agrupar corretamente as diferentes espécies do gênero, e os diferentes acessos de *Erianthus*. Curiosamente, os híbridos apresentaram uma maior diversidade que as outras espécies, inclusive *S. spontaneum*, espécie conhecida por possuir a maior diversidade genética do gênero.

Além do uso de dados oriundos de microssatélites na estimativa da diversidade genética, outros tipos de marcadores como AFLP (*amplified fragmente lenght polymorphism*) e dados morfológicos podem ser usados aumentando a acurácia da análise (Pereira et al., 2013). Farsangi et al. (2018) analisaram a diversidade de 55 genótipos de cana-de-açúcar, entre cultivares e acessos selvagens através de dados obtidos por SSR e TRAP (*target region amplification polymorphism*) obtendo padrão de agrupamento similares a outros estudos, confirmando a eficácia da associação de marcadores.

Silva et al. (2018) utilizaram a estratégia de associar marcadores moleculares a caracteres agronômicos quantitativos e qualitativos tais como tolerância a salinidade, em 130 acessos selvagens de *S*. *spontaneum*, via 12 pares de primers *SSR*s. A associação de ambos dados permitiu a geração de uma coleção nuclear e aplicação direta dos melhores genótipos em cruzamentos visando a geração de cana-energia. Diversos outros trabalhos relatam a combinação de dados agronômicos e de marcadores microssatélites no alcance de melhores resultados no melhoramento genético.

Singh et al. (2010) utilizaram marcadores derivados de *EST-SSR*s, microssatélites genômicos (gSSRs) e UGSM (*unigene sugarcane microsatellite markers*) para avaliar a diversidade genética e inter-relações de 84 acessos de *S*. *spontaneum*, *S. barberi*, *S. officinarum* e cultivares Indianas e não Indianas e puderam observar que, curiosamente, os *EST-SSR*s e UGSM foram mais polimórficos que os de gSSRs, contrastando com outros estudos. Os acessos tiveram uma baixa similaridade genética. No estudo, *S. spontaneum* mostrou a

maior diversidade genética, e as cultivares comerciais mostraram maior proximidade com *S. officinarum*.

Filho et al. (2013) no intuito de obter maior cobertura do genoma e consistência na estimativa da diversidade, empregaram marcadores do tipo microssatélites e RAPD para avaliar a variabilidade e diversidade genética de 23 cultivares comerciais e clones. Ambos os marcadores detectaram grande quantidade de polimorfismo, porém, apesar da facilidade e custo dos RAPD, estes não apresentam grande reprodutibilidade, fato suprido pelo SSRs, o que os torna ideais na identificação de cultivares (*fingerprint*) e atividades que são repetidas em programas de melhoramento genético.

Com o intuito principal de investigar a real taxonomia do gênero *Saccharum*, Brown et al. (2007) analisaram 30 acessos das diferentes espécies: *S. spontaneum*, *S. officinarum*, *S. robustum*, *S. sinense* e *S. barberi* e 6 clones cultivados. Utilizando apenas 15 pares de *primers* de microssatélites conseguiram distinguir todas as espécies, devido à alta ploidia da cana-de-açúcar, e à correta escolha dos pares de *primers*. Através de técnicas multivariadas, obtiveram resultado que reforçam a hipótese de que *S. robustum* pode ser ancestral de *S. officinarum*, e que *S. sinense* e *S. barberi* podem ter originado de outros ancestrais correlacionados, pois tiveram grande divergência em relação ao gênero *Saccharum*.

Os microssatélites são muito úteis no *fingerprint*, técnica que visa a identificação única de acessos, comparado com um código de barras genótipo-específico. Diversos estudos relatam a eficiência do uso destes marcadores no emprego desta técnica. Ali et al. (2017) utilizaram 21 pares de *primers* SSR em 91 cultivares chinesas lançadas desde 2005 no intuito de obter padrões únicos para cada cultivar para a identificação das mesmas. As análises foram feitas tanto em gel de poliacrilamida como eletroforese de capilaridade, este último apresentando maior número de locos polimórficos e PIC.

Apesar de novas tecnologias de marcadores, como o sequenciamento genético baseado em *SNP*s (*single nucleotide polymorphism*) para análise em cana-de-açúcar (Thirugnasambandam et al., 2018), os microssatélites têm alcançado resultados similares com a vantagem de gerarem menor quantidade de informação, o que torna o processo menos laborioso e mais econômico.

2.4. Panorama de energias renováveis no Brasil

Desde meados do século XVIII, com o advento da Revolução Industrial, a maior parte da demanda energética mundial é suprida a partir dos combustíveis fósseis (Mardegan e Souza, 2015). Desde lá, muitas modificações nos tipos de combustíveis ocorreram, sendo atualmente, o petróleo a forma predominante (maior fonte da matriz energética), especialmente por sua eficiência e versatilidade, gerando, além de energia, diversos tipos de produtos a partir de seu fracionamento.

Apesar de sua eficiência energética, é de conhecimento geral a problemática gerada na queima de combustíveis fósseis, especialmente o petróleo: por se concentrar em determinadas regiões globais, especialmente Oriente Médio, gera conflitos entre países; é uma fonte de energia não renovável, portanto findável; causa danos ambientais, contribuindo para o aquecimento global, devido à emissão de gases que aumentam o efeito estufa, especialmente o CO_2 (dióxido de carbono). Com o reconhecimento de seus efeitos nocivos, principalmente ambientais, e o aumento exorbitante do consumo de energia elétrica, tem-se buscado como solução as chamadas fontes de energia limpas, ou renováveis (Golgemberg, 2017).

Define-se como energia renovável, qualquer energia que seja oriunda de recursos naturais, e continuamente reestabelecidos (Goldemberg e Lucon, 2007). Diferente dos combustíveis fósseis, essas energias têm algumas vantagens, como seu baixo custo de produção, o fato de serem inesgotáveis, produzirem baixas quantidades de poluentes e emissão de gases que contribuem para o aumento do efeito estufa, preconizando o meio ambiente, o que faz delas uma alternativa energética.

Existem diversas fontes de energia renovável, sendo as principais: solar, eólica, hidráulica e por biomassa (ANEEL, 2011). A escolha do tipo de energia a ser explorada em cada país depende da disponibilidade e abundância de seus recursos renováveis. O Brasil, por ser um país de clima predominantemente tropical, e com abundante quantidade de água em determinadas regiões possui a maior parte (aproximadamente 65%) da energia elétrica oriunda das hidrelétricas (EPE, 2018).

Porém, a concentração da produção de energia elétrica, principalmente por hidrelétricas cria uma dependência, e em períodos de estiagem, por exemplo, a concessão de energia fica comprometida, como ocorreu em 2014 com um grande período de seca, resultando na falta de energia em diversos locais (Marengo et al., 2015). Além disso, a instalação de uma usina hidrelétrica causa diversos problemas ambientais, o que faz desta energia, apesar de renovável, não ser considerada uma fonte “limpa”. Por isso o ideal é que se tenha uma matriz energética diversificada e que seja ambientalmente sustentável, para que garanta segurança energética ao país (Dupont et al., 2015).

Em 2015, O Brasil estabeleceu como meta na COP-21 “21ª Conferência das Partes da Convenção-Quadro das Nações Unidas sobre Mudança do Clima” o alcance do uso de 45% de energias renováveis na matriz energética e redução de 43% de emissão dos gases geradores de Efeito Estufa (UNICA, 2016) e atualmente é o país do BRICS (Brasil, Rússia, Índia, China e África do Sul) que tem a maior participação de energia renovável na matriz de geração elétrica.

Apesar das vantagens do uso das energias renováveis no combate ao aquecimento global, e de possuir condições para explorar outros tipos, seu potencial é subaproveitado no Brasil, que ainda possui sua maior parcela da matriz energética oriunda de combustíveis fósseis, diferente de países como a Dinamarca, que já em 2013, possuía 60% de sua energia gerada a partir de energias renováveis (Dupont et al., 2015). Dentre os fatores que explicam esta discrepância, o baixo investimento governamental é o mais significativo.

A inserção das energias renováveis na matriz energética de um país depende, em primeira instância, de incentivos políticos e governamentais, que fomentarão o desenvolvimento científico e tecnológico (Silva, 2016) para que o uso de determinada energia seja disponibilizado de forma simples e rentável. É através de subsídios, e o apoio de políticas públicas que é possível aumentar a escala de produção, e assim, torná-la mais competitiva (Alisson, 2014).

Por isso, é fundamental que programas como o Proinfa (Programa de Incentivo às Fontes Alternativas) sejam criados. Criado em 2002, o Proinfa teve como principal objetivo aumentar a participação de fontes alternativas renováveis para geração de energia elétrica (ANEEL, 2015). Foi lançado em resposta imediata ao episódio de apagão ocorrido em 2001, onde as fontes de

energia renováveis foram consideradas uma alternativa para diversificar a matriz elétrica brasileira, até então, totalmente dependente das hidrelétricas.

Dentre as iniciativas em prol do uso se energias renováveis, o Proinfa tem destaque pois foi o pioneiro no sentido de pensar nas fontes alternativas como estratégia para o desenvolvimento nacional, sendo importante para mostrar ao setor privado a viabilidade nos investimentos em fontes alternativas, estabelecendo um mercado nacional para as mesmas (Lopes, 2011).

Depois do Proinfa, algumas políticas públicas foram criadas para cada tipo de energia. A energia eólica, hoje representa aproximadamente 8% da oferta na matriz elétrica brasileira (ANEEL, 2017), e teve seu primeiro incentivo público no Programa Emergencial de Energia Eólica (PROEÓLICA), estabelecido em 2001. Apesar do programa não ter alcançado bons resultados, foi importante para atrair empresas que apoiam as fontes de energia renovável.

Uma importante política pública que contempla a expansão do uso da biomassa como forma de energia, é o Renovabio. Esta política de incentivo sucroenergético tem como principal objetivo dar suporte à expansão da produção de biocombustíveis (MME, 2018). Consolidado em 2017, objetiva principalmente explorar o potencial do Brasil para produção de energia a partir da biomassa, seja para a produção de bioletricidade ou biocombustíveis. Esta fonte de energia renovável hoje representa 9% na matriz elétrica brasileira, atrás das fontes de origem fóssil e hidrelétrica, respectivamente (UNICA, 2018), e até 2030 a meta é que esta oferta seja de 18%.

2.5. Biomassa para produção de energia

Das fontes renováveis de energia, a que apresenta maior potencial de crescimento no Brasil é a oriunda da biomassa. Definida como toda matéria orgânica de origem vegetal ou animal que pode ser utilizada para a produção de energia (ANEEL, 2011), a biomassa tem recebido especial atenção devido ao fato de ser uma fonte extremamente versátil de energia: apresenta potencial tanto para geração direta de energia, como para a produção de combustíveis “limpos”, como etanol e biodiesel, e diversos produtos químicos (Souza et al., 2015).

O uso da biomassa como fonte de energia primária, é mais frequente em países em desenvolvimento (Matsuoka et al., 2012). Em países de clima tropical, este tipo de energia tem crescido cada vez mais, sendo o Brasil um país que possui grande potencial expansivo devido às condições edafoclimáticas que possibilitam o cultivo de diversas culturas “energéticas”, hoje liderando o *ranking* mundial do uso da biomassa na produção deste tipo de energia. É um dos poucos países no mundo com potencial para substituir as energias fósseis (Cortez et al., 2008), com a biomassa representando atualmente aproximadamente 9% da matriz energética brasileira, e a maior parte desta, proveniente do bagaço da cana-de-açúcar (ANEEL, 2017)

São muitos os exemplos de fontes de biomassa: plantas, resíduos em geral, sendo que a partir de cada fonte, podem ser produzidos diferentes produtos, ou serem convertidos em energia elétrica. O ideal é que a geração de energia se dê a partir de fontes que além de sustentáveis, tenham potencial para suprir a demanda energética, sendo os resíduos, em geral, as principais fontes por se enquadrarem nestes aspectos (Cortez et al., 2008). Apesar de grande quantidade de resíduos urbanos e industriais serem gerados, são restritos em quantidade para serem considerados fonte de energia primária, além de diversos em forma e composição. Desta forma, segundo Matsuoka et al. (2014) os subprodutos e cultivos agrícolas ricos em biomassa são a fonte com maior potencial.

A biomassa de origem vegetal tem sido priorizada em pesquisas por apresentar diversas vantagens: contribuem para a preservação do meio-ambiente com o mecanismo fotossintético responsável por converter o carbono atmosférico em biomassa (Carvalho-Netto et al., 2014); existência de ampla diversidade de plantas que podem ser usadas para este fim; versatilidade por poder ser usada para outros fins, além da produção de energia; do ponto de vista econômico-social, traz geração de empregos, e menor dependência da importação de energias fósseis (ANEEL, 2011).

Algumas espécies cultivadas apresentam características que as tornam aptas a produção de energia renovável, como: possuir mecanismo fotossintético C4 altamente eficiente na conversão de energia solar em química sob altas temperaturas; acúmulo de açúcares; alta capacidade de rebrota; produção de

fibra e biomassa em geral que permitam a posterior conversão em energia (Carvalho-Netto et al., 2014), além de apresentar crescimento rápido e de alto rendimento, de tal modo que a energia produzida exceda a energia do combustível fóssil (Waclawovski et al., 2010). As principais fontes de biomassa vegetal do mundo são: cana-de-açúcar, milho, eucalipto, e capim elefante.

Apesar de possuir uma grande quantidade de culturas energéticas, cada país possui a geração de energia a partir da fonte de biomassa adequada. Os Estados Unidos, por exemplo, tem sua maior parte da produção de etanol provindo do milho, vários países da Europa, da beterraba açucareira, já o Brasil, da cana-de-açúcar (Rodrigues et al., 2011).

A partir da biomassa proveniente da cana-de-açúcar é possível produzir energia de diferentes formas. Uma é a cogeração, produção simultânea de energia térmica ou mecânica que pode ser convertida em energia elétrica, beneficiando-se da energia gerada para consumo próprio ou venda. Este tipo de energia, chamado bioeletricidade, é gerado a partir da queima do bagaço e da palha, no qual, segundo o Instituto de Economia Agrícola (IEA) (2017), torna o setor sucroenergético autossuficiente, pois parte é utilizada para o funcionamento da usina, e o excedente utilizado na rede de distribuição, além de sua produção ocorrer no período da safra, complementando as hidrelétricas no período de seca.

Esta tecnologia tem crescido cada vez mais por agregar valor ao bagaço, um dos resíduos do processo de moagem da cana-de-açúcar para extração do caldo usado na produção de açúcar e/ou etanol. No período de 2004 a 2014, o país aumentou em 75% a produção de energia elétrica pelo bagaço de cana, e atualmente, o setor sucroenergético detém em torno de 7% da potência outorgada no Brasil (UNICA, 2018).

Além de energia elétrica gerada pela cana-de-açúcar, o etanol é um importante produto, sendo o Brasil, o segundo maior produtor mundial, com produção de 27,6 bilhões de litros (UNICA, 2018). Com a criação do Programa Nacional do Álcool (PROALCOOL) em 1974, o etanol ganhou maior espaço, e a partir de 2003 com o lançamento do veículo flex sua produção foi cada vez maior (Rodrigues, 2011). Com a consolidação do RENOVABIO, a tendência é que a produção de etanol e outros biocombustíveis aumente cada vez mais.

Produzido através do processo de fermentação do açúcar do caldo, ou do melaço, a produção de etanol está diretamente ligada com o uso sustentável de energia, por contribuir para a mitigação da emissão dos gases de efeito estufa, preconizando o meio ambiente e a saúde humana em geral (Rodrigues, 2011).

Além do etanol de primeira geração, tem-se buscado desenvolver tecnologias para geração do etanol de segunda geração em escala comercial. Neste tipo de combustível, a fermentação ocorre a partir da celulose e hemicelulose presentes na parede celular, ou seja, partir dos resíduos ricos em biomassa, como folha, palha e bagaço, agregando maior valor a esses resíduos, e aumentando ainda mais a sustentabilidade na produção deste combustível, com potencial de elevar cerca de 25% da produção de etanol (Goldemberg, 2017).

3. Referências Bibliográficas

Ali A et al. (2017) Molecular Identification and Genetic Diversity Analysis of Chinese Sugarcane (*Saccharum* spp. Hybrids) Varieties using SSR Markers. **Tropical Plant Biology** 10:194–203.

Ali A et al. (2019) Genetic diversity and population structure analysis of *Saccharum* and *Erianthus* genera using microsatellite (SSR) markers. **Scientific Reports** 9:395.

Alisson E. Bioenergia necessita de políticas públicas para avançar em escala global. Revista Fapesp. Disponível em: <http://agencia.fapesp.br/bioenergia-necessita-de-politicas-publicas-para-avancar-em-escala-global/20069/>.Acesso em: 10 nov. 2018.

Aneel. Fontes renováveis: Biomassa. In: **Atlas de energia elétrica do Brasil: Biomassa.** 1. ed. Brasil: ANEEL, 2011. p. 63–74.

Aneel. Programa de Incentivo às Fontes Alternativas. Disponível em: <http://www.aneel.gov.br/proinfa>. Acesso em: 10 nov. 2018. ANEEL, 2015.

Banco de Informações de Geração - BIG. **Capacidade Instalada de Energia Eólica**. Brasília: ANEEL, 2017.

Brown JS et al. (2007) 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** 54:627–648.

Carvalho-Netto O et al. (2014) The potential of the energy cane as the main biomass crop for the cellulosic industry**. Chemical and Biological Technologies in Agriculture** 1:1-20.

Chohfi FM, Valença GP (2009) Novos produtos e energia a partir de biomassa, uma matéria prima abundante e renovável para o Brasil. **Revista Agrogeoambiental.**

CONAB. Acompanhamento da Safra Brasileira - Cana-de-açúcar– Safra 2018/19, quarto levantamento. p. 8, 2019.

Cortez LAB, Lora, EES, Gómez EO (2008) Biomassa para energia. Campinas, SP: Editora Unicamp.

Crystian D. et al. (2018) Genetic diversity trends in sugarcane germplasm: Analysis in the germplasm bank of the RB varieties. **Crop Breeding and Applied Biotechnology** 18:426-43.

Da Costa MLM et al. (2011) Assessment of genetic diversity in contrasting sugarcane varieties using inter simple sequence repeat (ISSR) markers**. American Journal of Plant Sciences** 2:425.

Daniel J et al. (1975) The origin of the genus *Saccharum*. **Sugarcane Breeding Newsletter** 36:24-39.

Daniels J, Roach BT (1987) Taxonomy and Evolution. In: HEINZ, D. J. (Ed.). **Sugarcane Improvement through Breeding** 11:7–84.

D'Hont A et al. (1998) Determination of basic chromosome numbers in the genus *Saccharum* by physical mapping of ribosomal RNA genes. **Genome** 41:221–225.

D'Hont, A et al. (2002) Oligoclonal interespecific origin of 'North Indian' and 'Chinese' sugarcanes. **Chromosome Research** 10:253-262.

Diola V, Barbosa MHP, Vegia CFM (2014) Molecular markers EST-SSRs for genotype-phenotype association in sugarcane. **Sugar Tech** 16:241–249.

Dos Santos JM (2014) Efficiency of biparental crossing in sugarcane analyzed by SSR markers. **Crop Breeding and Applied Biotechnology** 14:102-107.

Dupont HD, Grassi F, Romitti L (2015) Energias Renováveis: buscando por uma matriz energética sustentável. Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental. Santa Maria, v.19, n-1, Ed. Especial, p. 70-81. Universidade Federal de Santa Maria.

Ensinas AV et al. (2007) Analysis of process steam demand reduction and electricity generation in sugar and ethanol production from sugarcane. **Energy Conversion and Management** 48:2978-2987.

EPE - Empresa de Pesquisa Energética - Balanço Energético Nacional (BEN) 2018: Ano base 2017.Disponível em: <http://epe.gov.br/pt/publicacoes-dados-abertos/publicacoes/balanco-energetico-nacional-2018> Acesso em: 17 jan. 2018

Faleiro FG (2007) **Marcadores genético-moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos**. 1. ed. Planaltina, DF: EMBRAPA-Cerrados. 102p.

Farsangi FJ et al. (2018) Assessment of the Utility of TRAP and EST-SSRs Markers for Genetic Diversity Analysis of Sugarcane Genotypes. **Cytology and Genetics** 52:467-477.

Ferreira ME, Grattapaglia D (1998) **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília: EMBRAPA.

Figueiredo P (2010) Breve história da cana-de-açúcar e do papel do Instituto Agronômico de Campinas no seu estabelecimento no Brasil. em: DINARDO-

MIRANDA, L.; Vasconcelos, A. C. M. de; Landell, M. G. A. (Org.). **Cana-de-Açúcar**. Campinas: Instituto Agronômico, p. 31-44.

Goldemberg J, Lucon, O (2007) Energias renováveis: um futuro sustentável. **Revista USP** 72:6-15.

Goldemberg J (2017) Atualidade e Perspectivas no Uso de Biomassa para Geração de Energia. **Revista Virtual de Quimica** 9:15–28.

Govindaraj P et al. (2014) Collection, Characterization and Phenotypic Diversity of *Saccharum spontaneum* L. from Arid and Semi Arid Zones of Northwestern India. **Sugar Tech** 16:36–43.

Heinz DJ et al. (1994) SUGARCANE. **Encyclopedia of Agricultural Science** 4:225-238.

Henry RJ, Kole C (2010) Genetics, genomics and breeding of sugarcane. **Science Publishers**, Inc.

Instituto de Economia Agrícola (IEA). Geração de Bioenergia de Biomassa da Cana-de-açúcar nas Usinas Signatárias ao Protocolo Agroambiental Paulista, Safra 2015/2016. Disponível em: <http://www.iea.agricultura.sp.gov.br/out/LerTexto.php?codTexto=14278>. Acesso em: 14 jan. 2018.

Irvine J (1999) *Saccharum* species as horticultural classes. **Theoretical and Applied Genetics** 98:186-194.

James BT et al. (2011) Development of microsatellite markers in autopolyploid sugarcane and comparative analysis of conserved microsatellites in sorghum and sugarcane. **Molecular Breeding** 30:661–669.

Jarne P, Lagoda PJL (1996) Microsatellites, from molecules to populations and back. **Trends in Ecology & Evolution** 11:424-9.

Liu XL et al. (2016) Genetic diversity of populations of *Saccharum spontaneum*, with different ploidy levels using SSR molecular markers. **Sugar Tech** 18:1–8.

Lopes LV (2011) **Políticas de incentivo às fontes às fontes alternativas de energia elétrica no Brasil**. (Monografia – Bacharelado em Ciências Econômicas – Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas.

Mancini MC et al. (2018) Targeted Sequencing by Gene Synteny,- a New Strategy for Polyploid Species: Sequencing and Physical Structure of a Complex Sugarcane Region. **Frontiers in Plant Science** 9:183-193.

Mardegan GE, Souza AB (2015) Recursos Energéticos e a vez do Biocombustível no Peru. In: XI Encontro Nacional da Associação de Pós-Graduação e Pesquisa em Geografia, 2015, Presidente Prudente. A diversidade da Geografia Brasileira: Escalas e Dimensões da Análise e da Ação.

Marengo JA et al. (2015) A seca e a crise hídrica de 2014 -2015 em São Paulo. **Revista USP** 116:31-44.

Matsuoka S et al. (2012) Bioenergia da Cana. In: SANTOS, F; BORÉM, A; CALDAS, C. (Ed.) Cana-de-açúcar: Bioenergia, Açúcar e Álcool. 2 ed. Viçosa: UFV, v.q, p. 487-517.

Matsuoka S et al. (2014) Energy Cane: Its Concept, Development, Characteristics, and Prospects. **Advances in Botany** 1-13.

Ming R et al. (2006) Sugarcane Improvement through Breeding and Biotechnology**. Plant Breeding Reviews** v.27.

MME – Ministério de Minas e Energia. RenovaBio. p.1-12. 2018.

Morgante M, Hanafey M, Powell W (2002) Microsatellites are preferentially associated with non repetitive DNA in plant genomes. **Nature Genetics** 30:194-200.

Mukherjee SK (1957) Origin and distribution of *Saccharum*. **Botanizal Gazette**, v. 119, p.55-56.

Nair NV et al. (2006) Analysis of genetic diversity among *Saccharum spontaneum* L. from four geographical regions of India, using molecular markers. **Genetic Resources and Crop Evolution** 53:1221–1231.

Oliveira EJ et al. (2006) Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetics and Molecular Biology** 29:294-307.

Parthiban S, Govindaraj P, Senthikulmar S (2018) Comparison of relative efficiency of genomic SSR and EST-SSR markers in estimating genetic diversity in sugarcane. **3 Biotech** 8:144.

Pereira MF et al. (2013) Genetic diversity in sugarcane cultivars assessed by DNA markers and morphological traits. **Revista Industrial y Agrícola de Tucumán** 90:59-62.

Pinto LR et al. (2004) Survey in the sugarcane expressed sequence tag database (SUCEST) for simple sequence repeats. **Genome / National Research Council Canada - Genome / Conseil national de recherches Canada** 47:795–804.

Roach BT (1972) Nobilisation of sugarcane. Proceedings International Society of Sugar Cane Technologists 14:206–216.

Rodrigues JAR (2011) Do engenho à biorrefinaria. Usina de açúcar como empreendimento industrial para geração de produtos químicos e biocombustíveis**. Quimica Nova** 34:1242-1254.

Sanghera GS et al. (2015) Genetic divergence among elite sugarcane clones (*Saccharum officinarum* L.) based on cane yield and quality traits from northern India. **Journal of Experimental Biology and Agriculture Sciences** 3:185–190.

Santos FA et al. (2012) Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Química Nova** 35:1004-1010.

Screenivasan TV, Ahloowalia BS, Heiz DJ (1987) Cytogenetics. In: HEINZ, D. (Ed.). Sugarcane improvement through breeding. Amsterdam: **Elsevier** 211-253.

Selvi A. et al. (2003) Evaluation of maize microsatellite markers for genetic diversity analysis for fingerprinting in sugarcane. **Genome** 46:394–403.

Silva CHF (2016) Uma reflexão sobre alternativas energéticas [livro eletrônico]. Companhia Energética de Minas Gerais. – Belo Horizonte: Cemig.

Silva JA (2017) The Importance of the Wild Cane *Saccharum spontaneum* for Bioenergy. **Sugar Tech** 1–39.

Silva JA et al. (2018) Agronomic and molecular characterization of wild germplasm *Saccharum spontaneum* for sugarcane and energy cane breeding purposes. **Scientia Agricola** 75:329-338.

Singh RK et al. (2010) Evaluation of microsatellite markers for genetic diversity analysis among sugarcane species and commercial hybrids. **Crop Science** 4:116-125.

Singh RB et al (2014) Molecular markers: Exploited in crop improvement practices. **Research in Environment and Life Sciences** 7:223-232.

Souza GM, Victoria RL, Verdade, LM et al. (2015) SCOPE bioenergy & sustainability: technical summary. In: Bioenergy & sustainability: bridging the gaps.

Tai PYP, Miller JD (2001) A Core Collection for *Saccharum spontaneum* L. from the World Collection of Sugarcane. **Crop Science** 41:879–88.

Thirugnasambandam PP, Hoang NV, Henry RJ (2018) The Challenge of Analyzing the Sugarcane Genome. **Frontiers in Plant Science** 9:616.

Tew TL, Cobill RM (2008) Genetic improvement of sugarcane (*Saccharum* spp.) as an energy crop. In: W Vermerris (ed) **Genetic Improvement of Bioenergy Crops** 249:272.

Tew TL, Pan YB (2010) Microsatellite (simple sequence repeat) marker-based paternity analysis of a seven-parent sugarcane polycross. **Crop Sciences** 50:1401-1408.

UNICA. COP21: Do compromisso à ação. Disponível em <http://www.unica.com.br/colunas/9851879920322737930/cop21-por-cento3A-do-compromisso-a-acao-/>. Acesso em: 19 de janeiro de 2018.

UNICA - União da indústria de cana-de-açúcar. FAQ- Maior produtor mundial de cana-de-açúcar. Disponível em: <**http://www.unica.com.br/faq**>. Acesso em: 27 de abril de 2017.

UNICA. A bioeletricidade da cana em números. **União da Indústria de Cana-de-Açúcar**, p. 1–6, 2018.

Waclawovsky AJ et al. (2010) Sugarcane for bioenergy production: An assessment of yield and regulation of sucrose content. **Plant Biotechnology Journal** 8:263–276.

Zhang M et al. (2004) Molecular Marker Application in Sugarcane. **Sugarcane Biotechnology** 6:251 – 259.

CAPÍTULO 2 - Caracterização e análise da estrutura genética de acessos de *S. spontaneum* e cultivares de cana-energia, e obtenção de uma coleção nuclear de *S. spontaneum.*

1. Introdução

Os Bancos de germoplasma possuem a finalidade de preservar a variabilidade genética de acessos provindos de diferentes regiões geográficas e de servir de subsídio para programas de melhoramento genético. São considerados reservatórios de genes de interesse por deter grande quantidade de informação que pode ser explorada para fins específicos. Constantemente, precisam ser enriquecidos por novos acessos e caracterizados assegurando a sua correta manutenção (Faleiro, 2007).

O Complexo *Saccharum* engloba espécies do gênero *Saccharum* e outros gêneros correlatos que se intercruzam (Daniels e Roach, 1987), assim, os bancos de germoplasma de cana-de-açúcar tendem a possuir grande variabilidade genética interespecífica e intraespecífica, sendo compostos por acessos de distintas regiões geográficas (Nayak et al., 2014). O conhecimento da variabilidade genética existente em um banco de germoplasma é de extrema importância por fornecer uma estimativa de quanto da diversidade está inserida em híbridos comerciais, e ainda, quanto pode ser usado como recurso para novas hibridações (Aitken et al., 2018; Manechini et al., 2018).

Uma estratégia que vem sendo utilizada para promover uma melhor gestão dos bancos de germoplasma de cana-de-açúcar bem como a sua utilização tem sido a obtenção de coleção nuclear (Nayak et al., 2014; Silva et al. 2018; Tai e Miller, 2001). Por existirem diversos acessos de diferentes espécies, esta estratégia tem sido adotada por resumir a variabilidade genética em uma coleção menor de acessos que seja representativa da coleção inteira sem que haja perda da variabilidade genética.

Os marcadores moleculares constituem uma ferramenta de grande valia para auxiliar na mensuração e organização da variabilidade genética acessada ao nível do DNA das coleções de germoplasma e promover o seu uso por parte dos programas de melhoramento (Nayak et al., 2014).

Marcadores moleculares do tipo microssatélites têm se destacado na investigação da variabilidade genética presente em bancos de germoplasma de cana-de-açúcar (Singh et al., 2014, Nayak et al., 2014, Manechini et al., 2018). Estes marcadores demandam pouca quantidade de DNA, são altamente polimórficos, reprodutíveis, e possuem alta cobertura do genoma (Oliveira et al., 2007), o que os torna uma opção adequada para análise de acessos de cana-de-açúcar. Os dados gerados pelos marcadores microssatélites refletem em grande parte o pedigree dos indivíduos analisados.

Com o reconhecimento da biomassa da cana-de-açúcar como suprimento energético, e subsequente surgimento da chamada cana-energia, torna-se imprescindível a correta caracterização de acessos de *Saccharum spontaneum*, principal espécie envolvida na geração de novos híbridos deste perfil de cana-de-açúcar. Por ser a espécie que possui maior diversidade genética do gênero (Silva, 2017), a correta caraterização contribui para uma maior eficiência na geração de híbridos superiores.

O banco de germoplasma do Programa de Melhoramento Genético de Cana-de-Açúcar do IAC tem realizado importações de acessos de germoplasma básico de cana-de-açúcar das Coleções de Germoplasma da *Sugar Research Australia* (Meringa, Austrália) e da *World Sugarcane and Related Grasses Collection* do USDA/ARS. Uma parte destes acessos, compostos majoritariamente por *S. spontaneum* já foi caracterizada por meio de marcadores do tipo microssatélites (Oriolo, 2016; Manechini, 2017) para compor o Banco de Perfil Molecular do Programa de Melhoramento Genético de Cana-de-Açúcar do Instituto Agronômico (IAC). Entretanto, acessos já quarentenados referentes à ultima importação, ainda não foram caracterizados.

Neste sentido, este trabalho teve como objetivo principal caracterizar um grupo de acessos de *S. spontaneum* e cultivares de cana-energia via marcadores microssatélites. Além disso, buscou-se verificar a contribuição destes novos acessos na diversidade genética da coleção pré-existente de *S. spontaneum* e a distribuição desta nova diversidade alélica introduzida com relação a cultivares comerciais, cana-energia e uma coleção nuclear de *S. officinarum*. Ainda, com a inclusão destes novos acessos no banco de perfil

molecular foi estabelecida uma coleção nuclear para *S. spontaneum,* cuja diversidade foi comparada com a da coleção total dos acessos.

2. Materiais e métodos

2.1 Material vegetal

Para a execução deste trabalho foram explorados dados de genotipagem depositados no Banco de Perfil Molecular do Programa de Melhoramento Genético de Cana-de-Açúcar do Instituto Agronômico de Campinas (IAC). Dos 222 acessos utilizados (Tabela 1), 180 foram previamente genotipados por Oriolo (2014) e Manechini (2017). Destes 180, 148 são acessos de *S. spontaneum*, 17 cultivares comerciais de cana-de-açúcar mais plantadas na safra de 2016/2017 na região centro-oeste, e 15 acessos de *S. officinarum* provenientes de uma coleção nuclear (Manechini, 2017). Além destes 180 acessos, 42 novos acessos foram genotipados para serem incorporados ao Banco de Perfil Molecular, dos quais 30 são acessos de *S. spontaneum* e híbridos desta espécie, e 12 são cultivares de cana-energia (Vertix), sendo 6 do tipo I e 6 do tipo II, concedidas pela empresa Gran Bio®. Os acessos genotipados fazem parte da última importação da Coleção Mundial de Cana-de-Açúcar, da "World Sugarcane and Related Grasses Collection" do USDA/ARS - *United States Department of Agriculture/Agricultural Research Service*, localizada em Miami, FL, EUA. Os acessos utilizados no presente estudo foram escolhidos de acordo com a possível contribuição para a geração de novos híbridos de cana-energia, portanto um maior enfoque foi dado à espécie *Saccharum spontaneum*.

Tabela 1: Relação dos 222 acessos utilizados para este estudo, com suas respectivas espécies e origem.

Genótipo	Espécie	Origem	Genótipo	Espécie	Origem
DACCA	*S. spontaneum*	Índia	PBG84523	*S. spontaneum*	Filipinas
DJANTOER	*S. spontaneum*	Indonésia	PBG84525	*S. spontaneum*	Filipinas
FORMOSA	*S. spontaneum*	Taiwan	PPGN84813	*S. spontaneum*	Filipinas

GEHRABON	*S. spontaneum*	índia	PGN84814	*S. spontaneum*	Filipinas
HOLES1	*S. spontaneum*	-	PBG841216	*S. spontaneum*	Filipinas
IK76049	*S. spontaneum*	EUA- Havaí	PCAV8469	*S. spontaneum*	Filipinas
IN8488(2)	*S. spontaneum*	Indonésia	PCAV84630	*S. spontaneum*	Filipinas
IN84009	*S. spontaneum*	Indonésia	PCANOR8436	*S. spontaneum*	Filipinas
IN84011	*S. spontaneum*	Indonésia	PCAV891811	*S. spontaneum*	Filipinas
IN84021	*S. spontaneum*	Indonésia	PCAV841812	*S. spontaneum*	Filipinas
IN84022	*S. spontaneum*	Indonésia	PCANOR84127	*S. spontaneum*	Filipinas
IN84089	*S. spontaneum*	Indonésia	PCANOR8902	*S. spontaneum*	Filipinas
IS76125	*S. spontaneum*	EUA- Havaí	PANAMA	*S. spontaneum*	-
IS76173	*S. spontaneum*	EUA- Havaí	SES35379	*S. spontaneum*	Índia
IS76192	*S. spontaneum*	EUA- Havaí	SES26920	*S. spontaneum*	Índia
IS76196	*S. spontaneum*	EUA- Havaí	SES26431	*S. spontaneum*	Índia
M.MOENTAI	*S. spontaneum*	Indonésia	SES07338	*S. spontaneum*	Índia
NG26011	*S. spontaneum*	Papua-N. Guiné	SES2342	*S. spontaneum*	Índia
NG77176	*S. spontaneum*	Papua-N. Guiné	SES845824	*S. spontaneum*	Índia
PAL8401	*S. spontaneum*	Filipinas	SES35377	*S. spontaneum*	Índia
PCASUR8401	*S. spontaneum*	Filipinas	SES07322	*S. spontaneum*	Índia
PCASUR8403	*S. spontaneum*	Filipinas	SES2081	*S. spontaneum*	Índia
PCASUR8408	*S. spontaneum*	Filipinas	SES27710	*S. spontaneum*	Índia
PCASUR8413	*S. spontaneum*	Filipinas	SES2773	*S. spontaneum*	Índia
PCAV8413	*S. spontaneum*	Filipinas	TAIWAN1140	*S. spontaneum*	Taiwan
PCAV8420	*S. spontaneum*	Filipinas	THA82060	*S. spontaneum*	Tailândia
PHILLIPINEWILD	*S. spontaneum*	Filipinas	KAWANDA	*S. spontaneum*	Uganda
PONAPPEWILD	*S. spontaneum*	Japão	KLOET	*S. spontaneum*	Indonésia
PPGN8408	*S. spontaneum*	Filipinas	PURPLE32	*S. spontaneum*	-
PQ8404	*S. spontaneum*	Filipinas	GLAGAHKLOET	*S. spontaneum*	Indonésia
PQ8409	*S. spontaneum*	Filipinas	CANE604417	*S. spontaneum*	-
PSOR8413	*S. spontaneum*	-	CANE604418	*S. spontaneum*	-
S66084	*S. spontaneum*	Taiwan	51NG26	*S. spontaneum*	Papua-N. Guiné
S66097	*S. spontaneum*	Taiwan	78217273	*S. spontaneum*	-
S66105	*S. spontaneum*	Taiwan	FORMOSA429	*S. spontaneum*	Taiwan
SSPONT28	*S. spontaneum*	Taiwan	BROWN33	*S. spontaneum*	-
SES033	*S. spontaneum*	Índia	B68264	*S. spontaneum*	-
SES084/58	*S. spontaneum*	Índia	MOL6446	F1 *S. spontaneum*	-
SES088C	*S. spontaneum*	Índia	Q47125	*S. spontaneum*	-
SES090	*S. spontaneum*	Índia	SES011	*S. spontaneum*	Índia
SES092	*S. spontaneum*	Índia	MOL6427	F1 *S. spontaneum*	-
SES103	*S. spontaneum*	Índia	US56-151	*S. spontaneum*	-
SES184B	*S. spontaneum*	Índia	IA3107	F1 *S. spontaneum*	-
SES184A	*S. spontaneum*	Índia	Q46394	*S. spontaneum*	-
SES197A	*S. spontaneum*	Índia	CPDAU84-9678	*S. spontaneum*	Flórida
SES208	*S. spontaneum*	Índia	S. kanashiroi	*S. spontaneum*	Japão
SES234	*S. spontaneum*	Índia	22-95	*S. spontaneum*	-
SES295	*S. spontaneum*	Índia	Barbados White Sport	F1 *S. spontaneum*	Índia
SES297A	*S. spontaneum*	Índia	Spont14095	*S. spontaneum*	
SES308A	*S. spontaneum*	Índia	H51-90011	*S. spontaneum*	China

SES323	*S. spontaneum*	Índia	IN84-012F14	*S. spontaneum*	Indonésia
SES365	*S. spontaneum*	Índia	IND81-191	*S. spontaneum*	Índia
SES367	*S. spontaneum*	Índia	LOUCANE	F1 *S. spontaneum*	-
SES519	*S. spontaneum*	Índia	IK76-072	*S. spontaneum*	-
SES602	*S. spontaneum*	Índia	N26-14	F1 *S. spontaneum*	-
SES205A	*S. spontaneum*	Índia	Q46127	*S. spontaneum*	-
SES196	*S. spontaneum*	Índia	N26-14(2)	F1 *S. spontaneum*	-
SH301	*S. spontaneum*	Índia	Q47126	*S. spontaneum*	-
SM8136	*S. spontaneum*	-	Q47128	*S. spontaneum*	-
TAIWAN2N=96	*S. spontaneum*	Taiwan	19-95	*S. spontaneum*	-
TAIWANSPONT64	*S. spontaneum*	Taiwan	SES220	*S. spontaneum*	Índia
TAIWANSPONT72	*S. spontaneum*	Taiwan	IND81-136	*S. spontaneum*	Índia
THA83/71	*S. spontaneum*	Tailândia	SES004A	*S. spontaneum*	Índia
UM69015	*S. spontaneum*	Malásia	Spont8489	*S. spontaneum*	-
US4633	*S. spontaneum*	EUA - Flórida	Unknown(R65P42)	F1 / S. spontaneum	-
US5601601	*S. spontaneum*	Tailândia	06-95	*S. spontaneum*	-
US74069	*S. spontaneum*	-	IN8458	*S. spontaneum*	Indonésia
US78518	*S. spontaneum*	Paquistão	KRAKATAU	*S. spontaneum*	Indonésia
US78519	*S. spontaneum*	Paquistão	RB867515	*S. officinarum híbrido*	Brasil - RIDESA
US78523	*S. spontaneum*	Paquistão	RB966928	*S. officinarum híbrido*	Brasil - RIDESA
YACHENG12	*S. spontaneum*	China	SP813250	*S. officinarum híbrido*	Brasil - CTC
IN76086	*S. spontaneum*	Indonésia	RB92579	*S. officinarum híbrido*	Brasil - RIDESA
IN845	*S. spontaneum*	Indonésia	RB855453	*S. officinarum híbrido*	Brasil - RIDESA
US851008(1)	*S. spontaneum*	Taiwan	RB855156	*S. officinarum híbrido*	Brasil - RIDESA
US85108	*S. spontaneum*	Taiwan	CTC04	*S. officinarum híbrido*	Brasil - CTC
NG5712	*S. spontaneum*	Papua-N. Guiné	RB855536	*S. officinarum híbrido*	Brasil - RIDESA
UK2215	*S. spontaneum*	-	SP832847	*S. officinarum híbrido*	Brasil - CTC
UK3734	*S. spontaneum*	-	SP801816	*S. officinarum híbrido*	Brasil - CTC
UK3739	*S. spontaneum*	-	SP801842	*S. officinarum híbrido*	Brasil - CTC
UK3748	*S. spontaneum*	-	RB835054	*S. officinarum híbrido*	Brasil - RIDESA
UK3759	*S. spontaneum*	-	CTC02	*S. officinarum híbrido*	Brasil - CTC
UK3765	*S. spontaneum*	-	IACSP955000	*S. officinarum híbrido*	Brasil - IAC
UK6913	*S. spontaneum*	-	SP803280	*S. officinarum híbrido*	Brasil - CTC
IK76006	*S. spontaneum*	EUA - Havaí	CTC09	*S. officinarum híbrido*	Brasil - CTC
TONGZA	*S. spontaneum*	China	CTC15	*S. officinarum híbrido*	Brasil - CTC
IN81014	*S. spontaneum*	Indonésia	VX120281	*S. spontaneum híbrido*	Brasil - GranBio
IN8401634	*S. spontaneum*	Indonésia	VX120543	*S. spontaneum híbrido*	Brasil - GranBio
IN84227	*S. spontaneum*	Indonésia	VX120781	*S. spontaneum híbrido*	Brasil - GranBio
IN8403336	*S. spontaneum*	Indonésia	VX120218	*S. spontaneum híbrido*	Brasil - GranBio
IN8404221	*S. spontaneum*	Indonésia	VX132309	*S. spontaneum híbrido*	Brasil - GranBio
IN8404237	*S. spontaneum*	Indonésia	VX121744	*S. spontaneum híbrido*	Brasil - GranBio
IN84088	*S. spontaneum*	Indonésia	VX130036	*S. spontaneum híbrido*	Brasil - GranBio
IN840918	*S. spontaneum*	Indonésia	VX132325	*S. spontaneum híbrido*	Brasil - GranBio
IND813819	*S. spontaneum*	Índia	VX120347	*S. spontaneum híbrido*	Brasil - GranBio
IND818235	*S. spontaneum*	Índia	VX132388	*S. spontaneum híbrido*	Brasil - GranBio
IND82257	*S. spontaneum*	Índia	VX133110	*S. spontaneum híbrido*	Brasil - GranBio
IND823184	*S. spontaneum*	Índia	VX120277	*S. spontaneum híbrido*	Brasil - GranBio

IM76234	*S. spontaneum*	Austrália	ZWARTMANILLA	*S. officinarum*	Indonésia
IK7666	*S. spontaneum*	EUA - Havaí	IJ76470	*S. officinarum*	Indonésia
IJ76111	*S. spontaneum*	Indonésia	IN84105	*S. officinarum*	Indonésia
IS76177	*S. spontaneum*	EUA - Havaí	SAC.OFF.828	*S. officinarum*	Malásia
IJ76480	*S. spontaneum*	Indonésia	IN8488(1)	*S. officinarum*	Indonésia
IS761715	*S. spontaneum*	EUA - Havaí	IS76155	*S. officinarum*	EUA - Havaí
IS76201	*S. spontaneum*	EUA - Havaí	NG2121	*S. officinarum*	Papua-N. Guiné
MOL4503	*S. spontaneum*	EUA - Havaí	RP8	*S. officinarum*	-
NG21035	*S. spontaneum*	Papua-N. Guiné	BRAVADEPERICO	*S. officinarum*	Cuba
US7851939	*S. spontaneum*	Paquistão	ZOPILOTA	*S. officinarum*	Costa Rica
SSPONT15	*S. spontaneum*	-	IJ76361	*S. officinarum*	Indonésia
SSPONT37	*S. spontaneum*	-	IJ76317	*S. officinarum*	Indonésia
SSPONT4593	*S. spontaneum*	-	NG57213	*S. officinarum*	Papua-N. Guiné
PAGN84226	*S. spontaneum*	-	AJAX	*S. officinarum*	Fiji

2.2. Extração de DNA

Os acessos selecionados tiveram seu DNA genômico total extraído de folhas jovens e isentas de doenças, através do método CTAB (Aljanabi e Forget; Dookun, 1999). A quantidade e qualidade do DNA foi checada através de gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídio, comparando com concentração de DNA lambda (λ) padrão.

2.3. Amplificação dos marcadores do tipo SSR

A reação de amplificação foi conduzida em um volume final de 15 µl contendo 80 ng de DNA genômico; 0,2 µM de cada par de *primer* SSR (marcado com corantes infravermelhos IR700 ou IR800), 100 µM de cada dNTP, 2 mM de $MgCl_2$, 10 mM de Tris-HCl, 50 mM de KCl e 0,5 unidade de Taq DNA polimerase (Invitrogen, São Paulo, Brasil).

Para a obtenção do perfil molecular foram utilizados um conjunto padrão de 12 pares de *primers* SSR (Oliveira et al. 2007, Manechini et al. 2017, Maccheroni et al. 2009). A sequência dos pares de *primers* SSRs (temperatura de anelamento, motivo, sequência e tamanho do fragmento amplificado) estão apresentados na Tabela 2. As condições de termociclagem foram: desnaturação inicial à 94ºC durante 3 minutos, seguida de 30 ciclos contendo uma denaturação inicial de 94ºC durante 1 minuto, temperatura de anelamento específica para

cada iniciador por 1 minuto, extensão à 72ºC por 1 minuto, finalizando por uma extensão final à 72ºC por 3 minutos.

Tabela 2: Pares de *primers* selecionados para este estudo e suas respectivas características: temperatura de anelamento, motivo, sequências “forward” e “reverse”.

SSR	Temperatura de anelamento	Motivos repetitivos	Sequência"forward" Sequência "reverse"	Tamanho do fragmento
CV29[1]	60ºC	(ATCT)14	TCGCGTCCACCAATGTAACC GCGTGCATCGCTTGTGTCTT	82-170
CV37[1]	60ºC	(TTTC)15	GGATGGACGACGTGTCCTGG ATAAAGTGGCCGCTTGGATTGA	106-177
CV318[1]	60ºC	(CTTTT)18	AAGCAGGGGCCTCAAGTTG GTCAAACAGGCGATCTGGCTC	96-210
CV60[1]	60ºC	(CTCTCC)5	AATCTGCACCCTGCCCTCTC CAGCTGGAGCATGGATGGAG	158-194
CV79[1]	60ºC	(CTATAT)11(TATAGA)6	GGCACTGCTGGTGGTTGATTG TCCCACATCAAGAGGCAGCTA	131-231
CV94[1]	60ºC	(AAAAAG)5(CGT)5	GGCAGGCCAAGATGAATGAAG AGCACAGCGGAGGGTACGG	182-234
CV106[1]	60ºC	(GGC)8	AAACAGAGCATACTCGAGGCC ACGTTGCTGACGAGGTTTTCC	78-162
SCB213[2]	62ºC	(TCC)6	AGCCGTCAGGGGTCAGG ATTCGATGGAGCCTGAGTGAG	247-337
SCB312[2]	64,7ºC	(TCC)7	AGTCCGTCGCCGTAATCATCTTG GCACCTCCTCCTTTCCTTCCTTATT	190-278
SCB381[2]	60ºC	(TAC)8	TGGAGCTCCGTCTTCTTGTT GCTAGCCCGTACATTGGGTA	190-257
SCB436[2]	60ºC	(GAG)5	AGTACGCCTGAGTCCTGACG AGGTGCAAGGGCTGATAGAA	158-274
SCB423[2]	- DISPONÍVEL SOB CONSULTA -			

[1,] Maccheroni et al., (2009); [2]Marconi et al., (2011);

2.4. Análise de dados

Os fragmentos amplificados foram separados em gel de poliacrilamida a 6% em eletroforese no analisador de DNA NEN4300 (LI-COR Biosciences®). As imagens dos géis foram analisadas e pontuadas com o software Saga GT ™ (LI-COR Biosciences®). Este software possui um sistema de calibragem de acordo com a altura/tamanho dos alelos a partir de um padrão de peso molecular, permitindo identificar alelos já existentes no banco e possíveis alelos novos. A

matriz binária é gerada a partir da pontuação de presença (1) e ausência de banda (0). Apesar dos microssatélites possuírem natureza codominante, em cana-de-açúcar, devido à poliploidia, são tratados como dominantes.

2.5. Cálculo do PIC, frequência alélica e diversidade gênica

O PIC (Conteúdo de Informação de Polimorfismo) foi calculado utilizando o programa *PIC Calculator* (Kemp, 2002), de acordo com Cordeiro, Pan e Henry (2003) segundo a expressão:

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^{n} p_i^2 - \sum_{i=1}^{n} \sum_{j=i+1}^{n} 2p^2 ip^2\, j$$

onde *p* é a frequência do *j*^{ésimo} padrão para o marcador *i* e *n* o número de alelos. A diversidade gênica (D) foi calculada para cada loco através do mesmo programa, de acordo com a expressão:

$$D = 1 - \sum_{i=1}^{n} P^2\, ij$$

na qual *Pij* é a frequência do *j*^{ésimo} padrão para o marcador *i,* somado dentre *n* padrões (Nei, 1973). A frequência alélica foi estimada em cada loco através da razão do número de cada tipo de alelo e o número total de alelos amplificados para o par de *primer* SSR em questão.

2.6. Análise da diversidade e estrutura genética

Através do software Structure v.2.3.4 (Evanno; Regnaut; Goudet, 2005; Pritchard; Stephens; Donnelly, 2000) foram inferidos os números de subpopulações (K) e a proporção de identidade entre os indivíduos (Q) adotando valor de K entre 1 a10 com 10 iterações e período de aquecimento de 100.000 e 200.000 repetições de “Markov chain Monte Carlo”. Os melhores valores de K e ΔK foram obtidos através do software “Structure Harvester” (Earl; Von-Holdt, 2010). A análise de variância molecular (AMOVA) entre os grupos formados foi calculada pelo software Arlequim v.3.5 (Excoffier e Lischer, 2010). Através do software MetaboAnalyst (Xia et al., 2009), uma Análise de Coordenadas Principais foi realizada, a fim de averiguar a existência de agrupamento entre os acessos, de acordo com os dados oriundos dos marcadores microssatélites.

2.7. Análise filogenética

A dissimilaridade em pares de acessos foi calculada através do coeficiente de Jaccard (Diss= 1 – Jaccard) e a obtenção da árvore filogenética pelo software DARwin v.6.0.13 (Perrier e Jacquemoud-Collet, 2006) utilizando o método “Unweighted Neighbor-Joining” com 1000 *bootstraps* (reamostragens).

2.8. Obtenção da coleção nuclear

A partir da função “Max-Lenght Subtree” foi gerada uma coleção nuclear pelo software DARwin (Schoen; Brown, 1993). A coleção foi obtida apenas a partir dos acessos de *S. spontaneum* que compõe o Banco de Germoplasma do IAC – Centro de Cana. A maioria dos acessos já compunha o banco previamente, e uma parte é remanescente da última importação que ainda não havia sido analisada. Buscou-se obter uma coleção nuclear com 25% dos acessos que de fato representasse a coleção inteira.

3. Resultados

3.1. Análise de polimorfismo dos *SSR*

O conjunto de 12 pares de *primers* SSR amplificaram 285 alelos sendo que, destes, 281 já compunham o banco de alelos e 4 são alelos novos introduzidos através dos acessos da última importação.

Todos os pares de *primers* apresentaram um número considerável de alelos variando de 10 (CV60) à 38 (SCC423) com média de 23,75 alelos por loco (par de SSR). No geral, todos os locos apresentaram altos valores de Conteúdo de Informação de Polimorfismo (PIC) variando de 0,808 (CV60) até 0,945 (SCB312). As estimativas para Diversidade Gênica (D) variaram de 0,830 (CV60) até 0,948 (SCB312) (Tabela 3).

Tabela 3: Dados referentes aos pares de microssatélites (SSRs). Número de alelos amplificados, Conteúdo de Informação de Polimorfismo (PIC) e Diversidade Gênica (D)

SSR	Alelo (No.)	PIC	D
CV29	22	0,909	0,915
CV37	19	0,883	0,891
CV38	30	0,928	0,932
CV60	10	0,808	0,830
CV79	27	0,928	0,932
CV94	16	0,866	0,878
CV106	16	0,871	0,883
SCB213	32	0,941	0,943
SCB312	30	0,945	0,948
SCB381	25	0,916	0,921
SCB436	20	0,881	0,890
SCC423	38	0,944	0,946

3.2. Análise da estrutura genética

O resultado obtido pela análise da estrutura genética dividiu os acessos avaliados em duas sub-populações (k=2, ΔK= 269.475) (Figura 1).

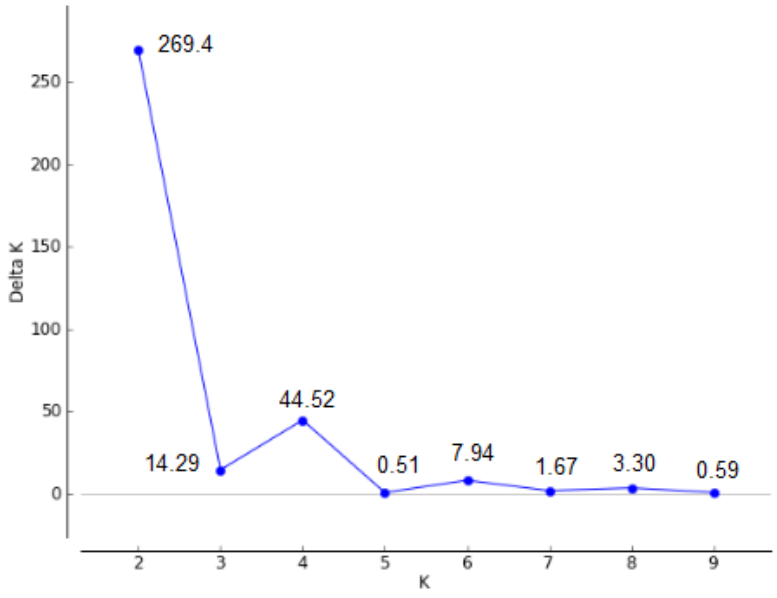


Figura 1: Análise para o melhor valor de k nos 222 acessos analisados, na qual o valor mais significativo é evidenciado pelo pico mais alto em k=2 (ΔK= 269.475), 2 subgrupos principais.

De acordo com a distribuição dos acessos em função da proporção de membro “*Membership proportion*” (Q) apresentado na Figura 2, verifica-se dois grupos bem separados, em que um (barras vermelhas) conteve a maioria dos acessos de *S. spontaneum* que já compunham o banco de dados, e alguns dos novos acessos introduzidos, enquanto o outro, abrigou as cultivares comerciais, cultivares de cana-energia, acessos de *S. officinarum*, alguns acessos de *S. spontaneum* que já compunham o banco de dados e alguns que foram introduzidos, especialmente híbridos. De acordo com a proporção de membro (Q) que reflete a proporção genômica que cada indivíduo tem de determinado grupo (subpopulação), os acessos de *S. spontaneum* mostraram homogeneidade a um único grupo (vermelhos) enquanto os demais acessos mostraram heterogeneidade com diferentes proporções de ambas subpopulações. As cultivares comerciais apresentaram homogeneidade em relação a proporção de membro (barra verde).

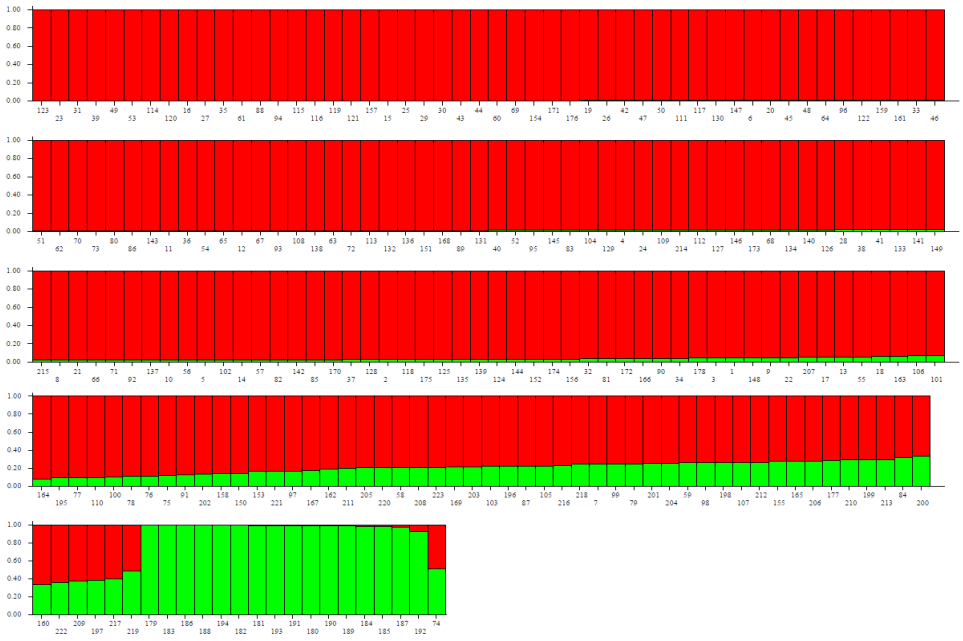


Figura 2: **“**Membership proportion” (Q) dos 222 indivíduos de acordo com o melhor valor de k (k=2; Δk= 269.475) separando em duas subpopulações principais. As barras vermelhas são acessos de *S. spontaneum*, as verdes são os demais genótipos. Cada barra mostra a proporção que determinado indivíduo tem de determinada subpopulação.

A partir da constatação da existência destes dois grupos principais pelo “Structure”, foi realizada a Análise de Variância Molecular (AMOVA) para

determinar a distribuição da variabilidade genética dentro e entre os grupos. O resultado da estimativa do índice de diferenciação genética (ΦST) foi de 0,0739 (P<0,001) indicando que 7,39% da variabilidade total está distribuída entre os grupos, enquanto o restante (92,61%) está dentro dos grupos (Tabela 3).

Tabela 3: Análise de Variância Molecular (AMOVA) para os dois grupos predefinidos (P<0,001).

Fonte de Variação	Graus de liberdade	Soma dos Quadrados	Estimativas de Variação	Porcentagem de Variação
Entre grupos	1	237,355	2,1859 Va	7,39*
Dentro dos grupos	221	6052,263	27,3858 Vb	92,61*
Total	222	6289,619	29.64125	$\Phi_{ST} = 0{,}0739$

A Análise de Coordenadas Principais (Figura 3) distribuiu os acessos de acordo com as respectivas espécies. O grupo de acessos de cana-energia mesclou-se entre os acessos de *S. spontaneum* e *S. officinarum*. As cultivares comerciais formaram um grupo mais delimitado e distante das demais espécies.

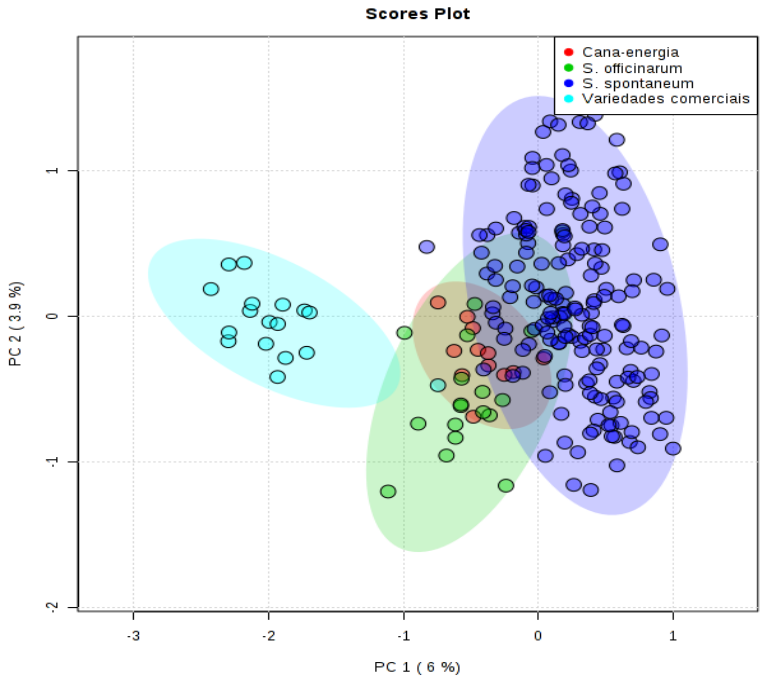


Figura 3: Análise de Coordenadas Principais dos 222 acessos gerada a partir dos dados de marcadores microssatélites (SSR). Cada acesso é representado de acordo com a espécie pertencente

3.3. Dissimilaridade e análise filogenética

Os dados oriundos da genotipagem deram origem à matriz de dissimilaridades, que por sua vez, serviram de subsídio para a confecção da árvore filogenética, ambas geradas pelo software “DARwin”. De acordo com a árvore filogenética (Figura 4) os acessos se agruparam de acordo com sua genealogia e espécie constatando-se a formação de dois grupos principais, bem definidos, corroborando com os resultados da análise da estrutura genética.

O grupo 1 foi composto por 152 acessos, sendo a maioria de *Saccharum spontaneum* que já faziam parte do banco de germoplasma, e 25 dos novos acessos. O grupo 2 foi formado por 70 acessos a partir de 4 subgrupos principais: alguns dos acessos da coleção de *S. spontaneum,* 4 acessos da última importação (Q46394, Barbados White Sport, N26-14, Spont14095) e 1 acesso de *S. officinarum* (IS76155); cultivares comerciais; cultivares de cana-energia e alguns de seus genitores; e a coleção nuclear de acessos da espécie *Saccharum officinarum.* Todos os acessos tenderam a se agrupar de acordo com sua espécie e genealogia. Os acessos US85108 e US851008(1), provavelmente são acessos duplicados (Manechini, 2017), e os acessos N26-14 e N26-14(2), que acreditava-se ser uma duplicação são acessos diferentes.

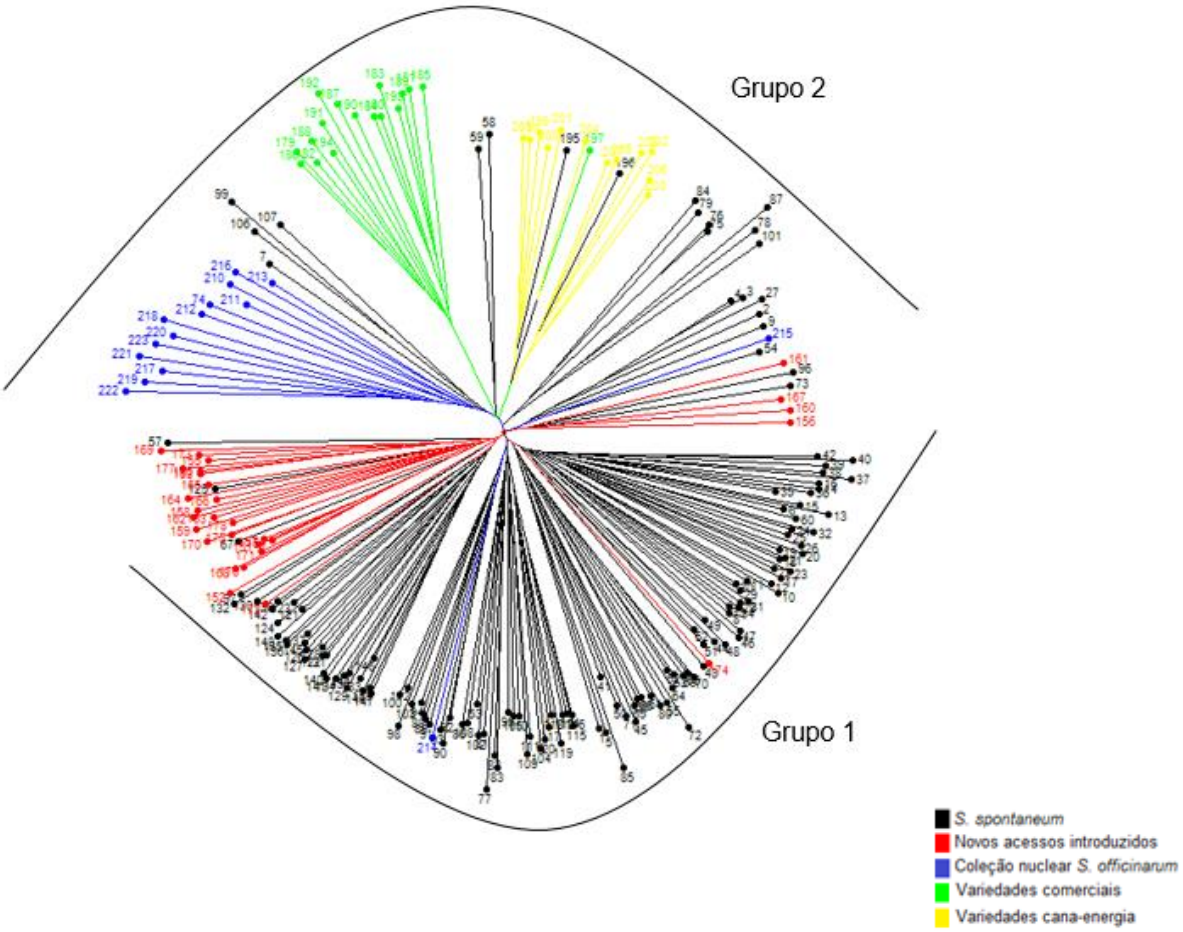


Figura 4: Árvore filogenética obtida a partir da função “Neighbor Joining” no software “DARwin”, contendo os 222 acessos e suas respectivas espécies.

3.4. Coleção nuclear

Uma coleção nuclear apenas de acessos de *S. spontaneum* foi criada a partir da função “Max Lenght Subtree” do software “DARwin”, onde objetivou-se reunir 25% dos acessos para representar toda a variabilidade genética existente desta espécie presente no banco de germoplasma. Cento e setenta e oito acessos de *S. spontaneum* foram submetidos à análise, destes, 148 já pertenciam ao banco, e 30 à ultima importação, posto que ainda não haviam sido analisados.

A coleção nuclear foi composta por 44 acessos (IS76125, PAL8401, PSOR8413, SSPONT28, SES090, SES033, SES184B, IN84021, SES208, SES295, YACHENG12, US78519, SH301, SES196, UK3739, US78523, IK76006, DACCA, N26-14 (2), Unknown(R65P42), IN84-012F14, Q46127, Q47126, H51-90011, 22-95, IND81-191, IND81-136, Barbados White Sport, PHILLIPINEWILD, PURPLE32, BROWN33, PCANOR8902, IN845, IM76234, IN81014, IND823184, IN8403336, SSPONT15, IS761715, NG5712, IS76177, SES35377, SES011, US7851939). Destes, 11 (SES011, Barbados White Sport, IND81-136, IND81-191, 22-95, H51-90011, Q47126, Q46127, IN84-012F14, Unknown(R65P42), N26-14(2)) pertencem à ultima importação (Figura 5).

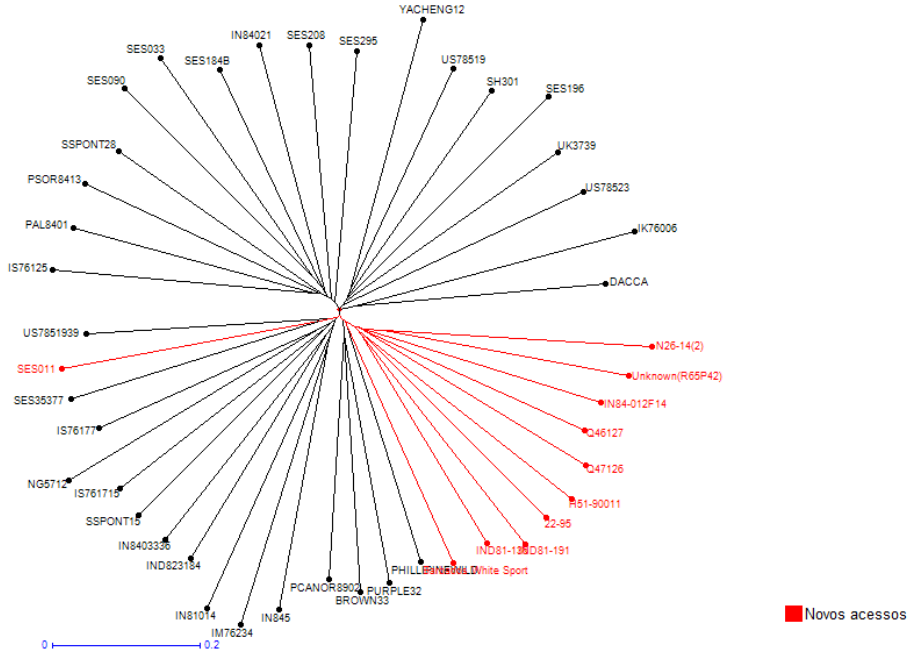
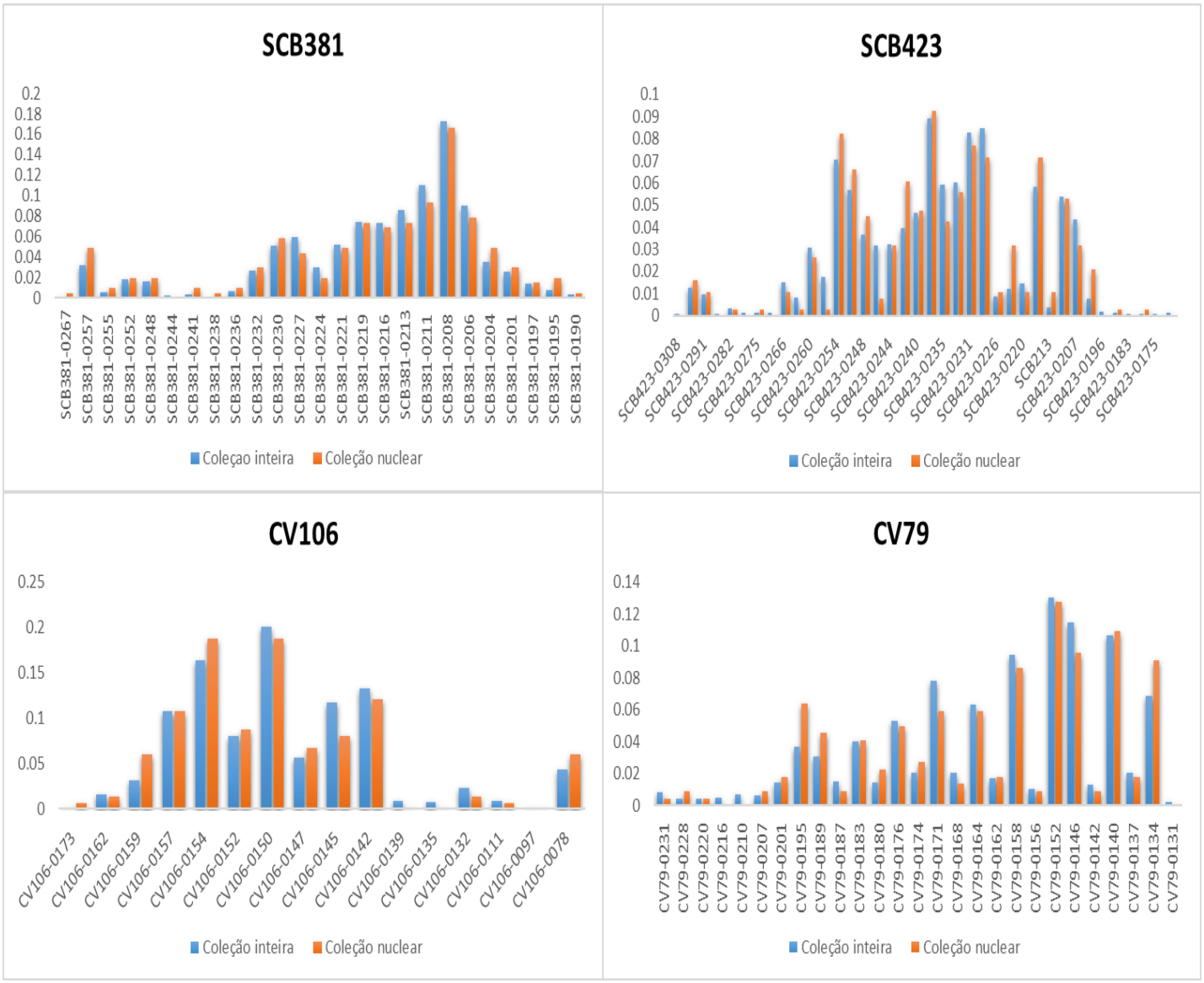
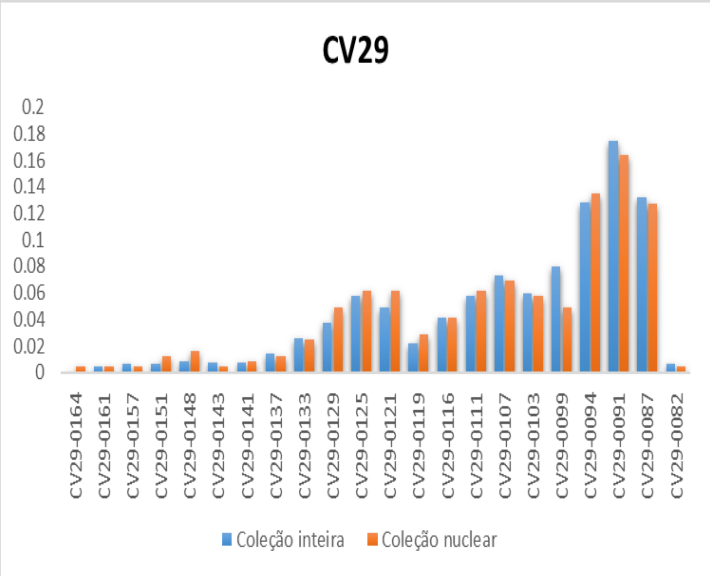
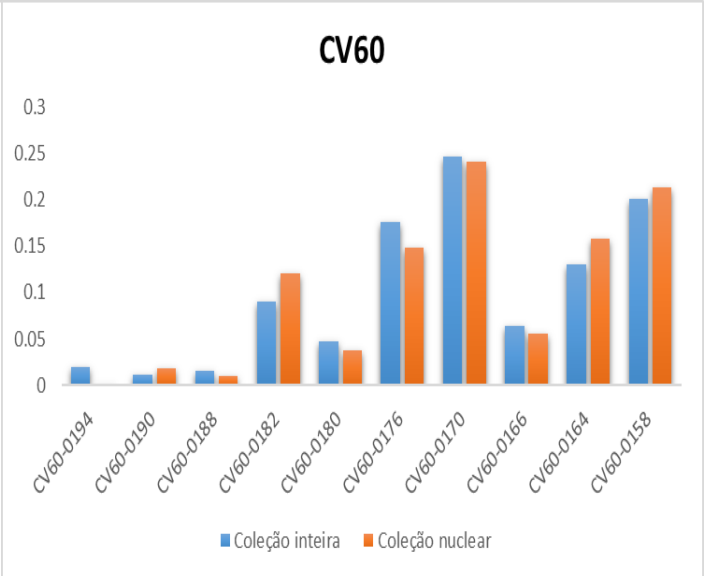


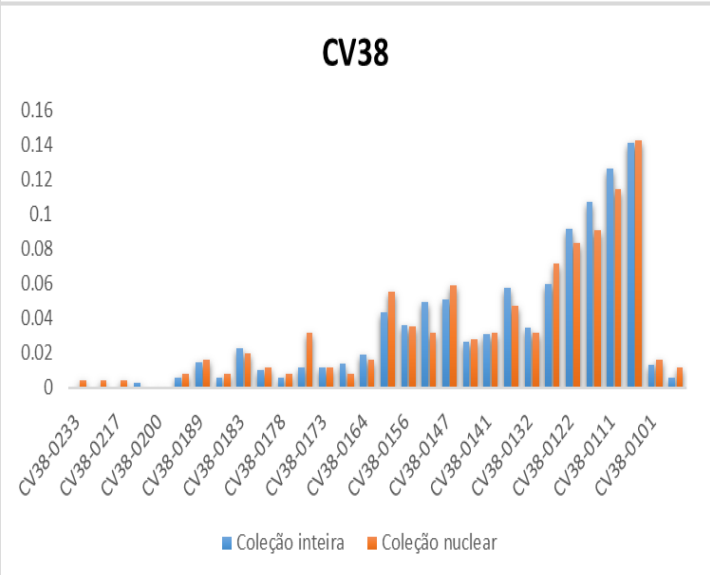
Figura 5: Árvore filogenética contendo os 44 acessos da coleção nuclear de *S. spontaneum*. Em vermelho, os novos acessos (11) de *S. spontaneum* introduzidos.

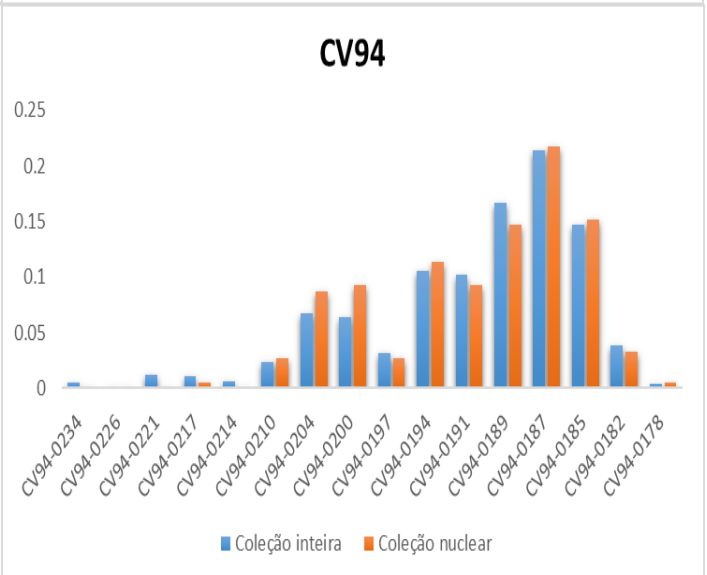
A fim de comparar a coleção inteira de acessos de *S. spontaneum* com a coleção nuclear, e verificar a representatividade desta, foi calculado o Conteúdo de Informação de Polimorfismo (PIC) e a Diversidade gênica média (D). O PIC médio resultou em 0,895 em ambos os conjuntos de genótipos analisados, e a Diversidade gênica média em 0,903 e 0,904 na coleção inteira e coleção nuclear, respectivamente. A dissimilaridade média entre os acessos da coleção nuclear foi de 0,714. A distribuição da frequência alélica, tanto da coleção inteira como para a coleção nuclear, também foi calculada e plotada em gráficos (Figura 6).

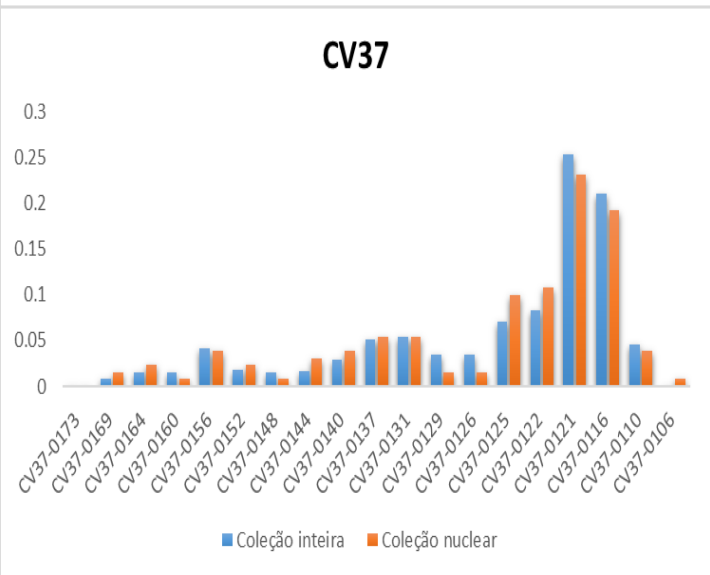


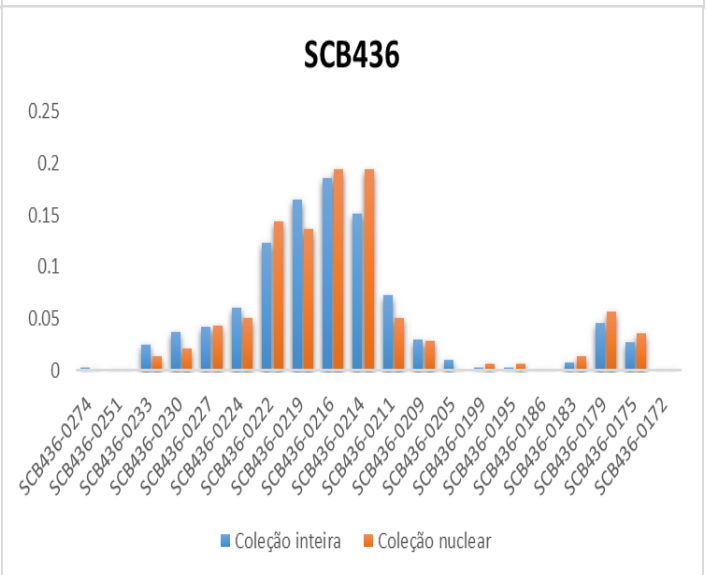

CV29
0.2
0.18
0.16
0.14
0.12
0.1
0.08
0.06
0.04
0.02
0
CV29-0164
CV29-0161
CV29-0157
CV29-0151
CV29-0148
CV29-0143
CV29-0141
CV29-0137
CV29-0133
CV29-0129
CV29-0125
CV29-0121
CV29-0119
CV29-0116
CV29-0111
CV29-0107
CV29-0103
CV29-0099
CV29-0094
CV29-0091
CV29-0087
CV29-0082
Coleção inteira
Coleção nuclear


CV60
0.3
0.25
0.2
0.15
0.1
0.05
0
CV60-0194
CV60-0190
CV60-0188
CV60-0182
CV60-0180
CV60-0176
CV60-0170
CV60-0166
CV60-0164
CV60-0158
Coleção inteira
Coleção nuclear


CV38
0.16
0.14
0.12
0.1
0.08
0.06
0.04
0.02
0
CV38-0233
CV38-0217
CV38-0200
CV38-0189
CV38-0183
CV38-0178
CV38-0173
CV38-0164
CV38-0156
CV38-0147
CV38-0141
CV38-0132
CV38-0122
CV38-0111
CV38-0101
Coleção inteira
Coleção nuclear


CV94
0.25
0.2
0.15
0.1
0.05
0
CV94-0234
CV94-0226
CV94-0221
CV94-0217
CV94-0214
CV94-0210
CV94-0204
CV94-0200
CV94-0197
CV94-0194
CV94-0191
CV94-0189
CV94-0187
CV94-0185
CV94-0182
CV94-0178
Coleção inteira
Coleção nuclear


CV37
0.3
0.25
0.2
0.15
0.1
0.05
0
CV37-0173
CV37-0169
CV37-0164
CV37-0160
CV37-0156
CV37-0152
CV37-0148
CV37-0144
CV37-0140
CV37-0137
CV37-0131
CV37-0129
CV37-0126
CV37-0125
CV37-0122
CV37-0121
CV37-0116
CV37-0110
CV37-0106
Coleção inteira
Coleção nuclear


SCB436
0.25
0.2
0.15
0.1
0.05
0
SCB436-0274
SCB436-0251
SCB436-0233
SCB436-0230
SCB436-0227
SCB436-0224
SCB436-0222
SCB436-0219
SCB436-0216
SCB436-0214
SCB436-0211
SCB436-0209
SCB436-0205
SCB436-0199
SCB436-0195
SCB436-0186
SCB436-0183
SCB436-0179
SCB436-0175
SCB436-0172
Coleção inteira
Coleção nuclear

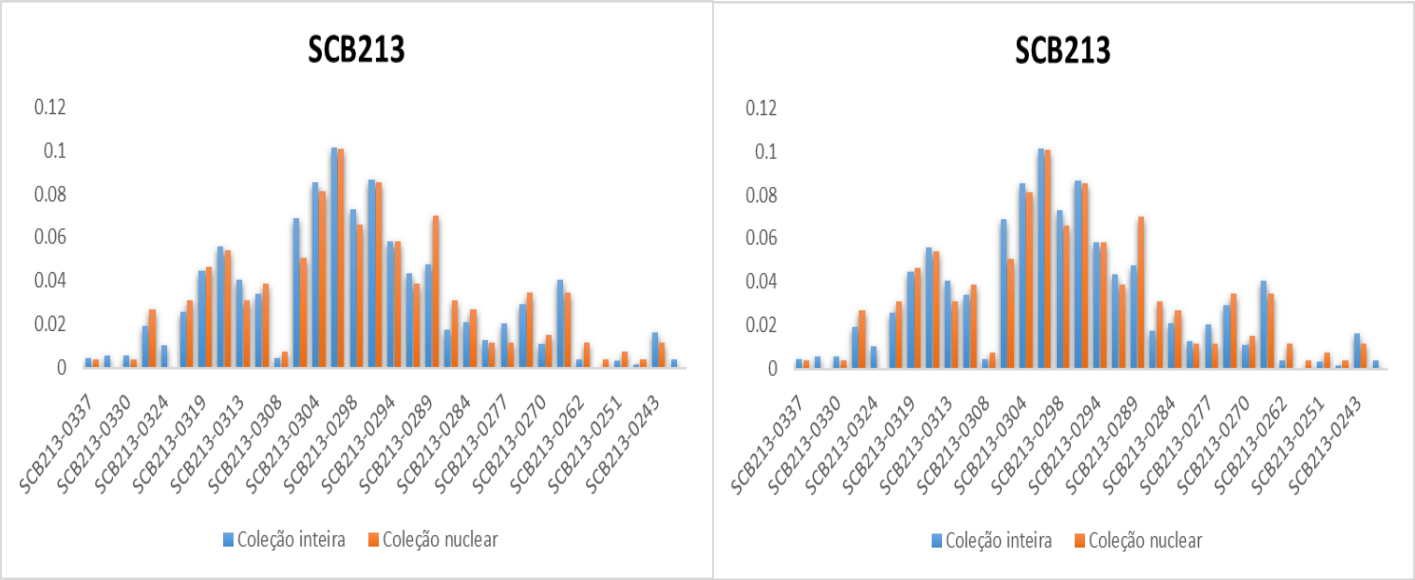


Figura 6: Representação gráfica das frequências alélicas em ambas as coleções (coleção nuclear e coleção inteira) para 12 locos de SSRs (SCB381; SCB423; CV106; CV79; CV29; CV60; CV38; CV94; CV37; SCB436; SCB213; SCB213). A barra azul representa a coleção inteira, e a laranja, a coleção nuclear. No eixo horizontal, encontram-se os alelos de cada par de iniciadores.

4. Discussão

Os doze pares de *primers* de microssatélites aqui utilizados constituem um conjunto padrão predefinido para a definição do perfil molecular dos acessos que integram a coleção de germoplasma de cana-de-açúcar do Programa de melhoramento genético de cana-de-açúcar do Instituto Agronômico (IAC). O potencial deste conjunto de SSRs já foi evidenciado por Manechini et al. (2018).

Uma das medidas mais utilizadas acerca da informatividade de um marcador é o PIC – Conteúdo de Informação de Polimorfismo, o qual deve contribuir para que o máximo de polimorfismo seja capturado.

Por ser poliploide e altamente heterozigótica, em cana-de-açúcar, microssatélites tendem a revelar um número elevado de alelos em um mesmo loco (Brown et al., 2007). O número de alelos capturados (285) por este conjunto de *primers* nos 222 acessos analisados foi elevado quando comparado com outros estudos, comprovando sua eficiência. Nayak et al. (2014) obtiveram um número reduzido de alelos amplificados (209) por um conjunto de 36 pares de

primers SSRs em uma população de 1002 acessos de diferentes espécies da Coleção Mundial de cana-de-açúcar e gramíneas.

Outros estudos também utilizando um número reduzido de pares de *primers* SSRs, como em Brown (2007), no qual, 15 pares de iniciadores foram aptos a distinguir as diferentes espécies de *Saccharum* e clones, e ainda identificar acessos rotulados incorretamente e de Silva (2018) em uma coleção de 130 acessos de *Saccharum spontaneum* com 12 pares de *primers* SSRs, foram suficientes para caracterizar os acessos e quantificar a variabilidade genética.

Dos 292 alelos existentes no banco de dados de perfil molecular referentes a esse conjunto de iniciadores, apenas 11 não estiveram presentes nos acessos analisados. O fato de a maioria dos acessos pertencerem a *S. spontaneum*, a espécie que possui maior diversidade genética dentro do gênero *Saccharum* (Cai et al., 2005) e também por ter sido incluído acessos de uma coleção nuclear de *S. officinarum*, cultivares comerciais e de cana-energia, também contribuiu para este alto número de alelos.

A correta caracterização, bem como a introdução de novos materiais em bancos de germoplasma é de extrema importância, para que a variabilidade genética seja mantida ou ampliada (Faleiro, 2007). Os 30 novos acessos de *S. spontaneum* contribuíram com 4 novos alelos, ampliando a variabilidade alélica do banco, ressaltando a importância de novas importações de acessos para incremento da variabilidade genética em um banco de germoplasma.

A análise da estrutura genética teve seu melhor resultado em k=2, sugerindo que o total de acessos avaliados pode ser dividido em dois grupos ou subpopulações, corroborando com os dados da árvore filogenética. O primeiro grupo composto exclusivamente por acessos de *S. spontaneum*, e o segundo, pelo restante dos acessos. *Saccharum spontaneum* é a espécie que possui maior diversidade do gênero *Saccharum* (Silva, 2017) e em análises de estrutura, com outras espécies, tendem a formar um grupo a parte (Nayak et al., 2014).

De acordo com a proporção de membro (Q), a maioria dos acessos de *S. spontaneum* possuem a quase totalidade de proporção do Grupo 1 (Q~100%). Os novos acessos introduzidos, geração F1 de *S. spontaneum* e as cultivares de

cana-energia tiveram uma pequena quantidade de proporção do Grupo 2, e a maioria do Grupo 1, explicados pelo fato de serem híbridos, como é o caso dos acesos MOL6446 (150), IA3107 (155), Barbados White Sport (160) e VX120281 (188). As cultivares comerciais de cana-de-açúcar tiveram sua maior proporção do grupo 2, algumas sem nenhuma identidade com o Grupo 1, como RB855453 (183), RB855536 (186) e SP801816 (188), o que pode ser explicado por serem um grupo com a base genética mais estreita (Landell e Bressiani, 2010), com pouca contribuição de *S. spontaneum*. Alguns acessos como o IN845 (74) e ZOPILOTA (219), ambos classificados como *S. officinarum,* e pertencentes à coleção nuclear previamente estabelecida, tiveram valores de Q exatamente na metade de cada um dos grupos.

O resultado proveniente da AMOVA e da estimativa de diferenciação genética (ΦST) indicou que a maior parte da diversidade (92,61%) está dentro dos grupos. Resultados similares foram reportados por Nayak et al. (2014) analisando três subgrupos, com a variação entre eles bem maior que dentro de cada grupo, e Manechini et al. (2018) onde a variação entre os grupos foi bem maior dentro que entre eles.

Corroborando com os resultados gerados pelo “Structure”, a árvore filogenética gerada pelo software DARwin mostrou claramente a existência de dois grupos, basicamente separando os acessos de *S. spontaneum* dos demais. Por ser a espécie mais diversa do gênero *Saccharum* (Govindaraj et al., 2014), *S. spontaneum* tende a se agrupar apenas com acessos da mesma espécie, ao passo que as outras espécies tendem a se agrupar juntas, o que ressalta evidências de que o gênero *Saccharum* é composto por duas espécies principais: *S. officinarum* e *S. spontaneum* (Nayak et al., 2014).

Muito se discute a respeito da base estreita das cultivares comerciais de cana-de-açúcar (Ukoskit et al., 2012). Manechini et al. (2018) analisando as principais cultivares comerciais plantadas no Brasil e acessos selvagens *de S. officinarum* e *S. spontaneum*, constatou que 97,6% dos alelos das cultivares provavelmente derivam destas espécies, e que 33% de alelos de *S. Spontaneum* eram exclusivos, mostrando o quanto há para ser explorado.

De fato, há muito a ser explorado em *S. spontaneum*, Aitken et al. (2018) analisando diversas coleções mundiais desta espécie, e cultivares comerciais

provenientes da China e Austrália, constataram que, grande parte da diversidade foi capturada, porém, em pequena frequência alélica.

A análise filogenética agrupou os acessos de acordo com sua genealogia e espécie. Isso fica bem claro no Grupo 2, onde os acessos formaram outros subgrupos dentro do grupo de acordo com sua espécie/genealogia. As cultivares de cana-energia se agruparam com alguns de seus genitores: IN8458 (195), KRAKATAU (196) e CTC15 (197), com aproximadamente 0,5 de dissimilaridade, o que já era esperado, dado o poder dos microssatélites em agrupar de acordo o pedigree (Maccheroni et al., 2009). As cultivares de cana-energia ficaram entre as cultivares comerciais e acessos de *S. spontaneum*, o que também já era esperado, pois estas são híbridos resultantes de cultivares comerciais, em geral utilizadas como fêmea e acessos de *S. spontaneum* como macho (Matsuoka et al., 2014). Entre elas, a dissimilaridade foi baixa pelo fato da maioria se tratar de meio-irmãos.

Os acessos de *S. officinarum* foram incluídos na análise para comprovar o maior *background* das cultivares comerciais provindos desta espécie, e é possível observar este fato com o grupo de cultivares comerciais bem próximo ao de *S. officinarum*. Os acessos duplicados IN8488(1) e IN8488(2), novamente foram agrupados com o inverso de suas classificações (Manechini et al., 2018) sugerindo que provavelmente são materiais trocados.

A dissimilaridade média entre todos os pares de acessos (0,73 ou 73%) foi alta. A menor dissimilaridade genética foi observada entre US85108 e US851008(1) apoiando os resultados de Manechini (2017) de que são os mesmos acessos com grafia errada. Assim, a menor dissimilaridade (0,2) foi considerada obtida entre GEHRABON e FORMOSA, ambos acessos de *S. spontaneum*, agrupados no Grupo 2. Os genótipos que tiveram a maior dissimilaridade (0,92) foram NG57213 e SSPONT15, acessos de *S. officinarum* e de *S. spontaneum*, respectivamente. N26-14 e N26-14(2), acessos que acreditava-se ser duplicações, foram agrupados em grupos diferentes, Grupo 2 e Grupo 1, respectivamente, provando que são genótipos diferentes.

A estratégia de obtenção de coleções nucleares tem sido muito útil em bancos de germoplasma por promoverem recursos genéticos para aplicação direcionada. No caso da cana-de-açúcar, os bancos de germoplasma possuem

uma grande quantidade de informação provindas de diferentes espécies do gênero *Saccharum*, e ainda, de gêneros correlatos. A obtenção de uma coleção nuclear visa simplificar a informação, resumindo a diversidade genética através da eliminação da redundância, sem que haja perda de informação (Nayak et al., 2014).

O melhoramento genético, e em especial, a obtenção de novos híbridos necessita do conhecimento dos recursos genéticos disponíveis. Para o desenvolvimento de novos híbridos de cana-energia, a obtenção de uma coleção nuclear de *Sacchaum spontaneum* é muito útil, especialmente por esta ser a espécie com maior diversidade do gênero *Saccharum* (Tai e Miller, 2001). Assim, em vez de caracterizar toda a coleção para posterior utilização em novas hibridações, o que envolve um processo laborioso, é mais viável e econômico que se utilize um número reduzido de acessos (Silva et al., 2017).

A coleção nuclear de acessos de *S. spontaneum* se mostrou apta a representar toda a coleção de acessos. Os parâmetros utilizados para comparar ambas a coleções mostraram valores semelhantes, sendo que a Diversidade gênica média foi ligeiramente maior na coleção nuclear, fato relatado também por Nayak et al. (2014). Na obtenção de uma coleção nuclear é importante que não haja perda drástica na frequência alélica (representação alélica), o que também não ocorreu quando a frequência alélica de ambos conjuntos de dados foi comparada**.** Dos 30 acessos da última importação, 11 integraram a coleção nuclear, ressaltando a importância da obtenção de novos acessos para um banco de germoplasma.

5. Referências Bibliográficas:

Aitken et al. (2018) Worldwide Genetic Diversity of the Wild Species *Saccharum spontaneum* and Level of Diversity Captured within Sugarcane Breeding Programs. **Crop Science** 58:218–229.

Aljanabi S, Forget L, Dookun A (1999) An improved and rapid protocol for the isolation of polysaccharide-and polyphenol-free sugarcane DNA. **Plant Molecular Biology Reporter** 17:1–8.

Brown JS et al. (2007) 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** 54:627–648.

Cai Q et al. (2005) Verification of the introgression of *Erianthus arundinaceus* germplasm into sugarcane.pdf. **Plant Breeding** 124:322–28.

Cordeiro GM, Pan YB, Henry RJ (2003) Sugarcane microsatellites for the assessment of genetic diversity in sugarcane germplasm. **Plant Science** 165:181–189.

Daniels J, Roach BT (1987) Taxonomy and Evolution. In: HEINZ, D. J. (Ed.). **Sugarcane Improvement through Breeding**. 1. ed. Amsterdan: Elsevier 11:7–84.

Dutra Filho JA et al. (2013) Utilização de marcadores moleculares RAPD e EST's SSR para estudo da variabilidade genética em cana-de-açúcar. **Revista Ciência Agronômica** 44:141-149.

Earl D, Von-Holdt, B (2010) STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. **Conservation Genetics Resources** 4:359–361.

Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. **Molecular Ecology** 14:2611–20.

Excoffier L, Lischer H (2010) Arlequin suite ver. 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular Ecology Resources** 10:564–567.

Faleiro FG (2007) **Marcadores genético-moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos**. 1. ed. Planaltina, DF: EMBRAPA-Cerrados, 102p.

Govindaraj P et al. (2014) Collection, Characterization and Phenotypic Diversity of *Saccharum spontaneum L*. from Arid and Semi Arid Zones of Northwestern India. **Sugar Tech** 16:36–43.

Kemp S (2002) **Pic Calculator**.

Landell MGA, Bressiani J (2010) Melhoramento Genético, Caracterização e Manejo Varietal. In.: Dinardo-Miranda LL, Vasconcelos AC e Landell MGA (Eds) Cana-de-açúcar, Campinas Instituto Agronômico de Campinas, p. 101-155.

Maccheroni W et al. (2009) Development of a dependable microsatellite-based fingerprinting system for sugarcane. **Sugar Cane Intl** 27:8–13.

Manechini JRV (2017) **Análise da estrutura genética do Banco de Germoplasma do Programa Cana – IAC por meio de marcadores moleculares**. 111 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia - Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

Manechini JRV et al. (2018) Unraveling the genetic structure of Brazilian commercial sugarcane cultivars through microsatellite markers. **Plos One** 13:4.

Marconi TG et al. (2011) Functional markers for gene mapping and genetic diversity studies in sugarcane. **BMC Research Notes** 4:264.

Matsuoka S et al. (2014) Energy Cane: Its Concept, Development, Characteristics, and Prospects. **Advances in Botany** 1-13.

Nayak SN et al. (2014) Promoting utilization of *Saccharum spp*. genetic resources through genetic diversity analysis and core collection construction. **PloS one** 9:10.

Nei M (1973) Analysis of Gene Diversity in Subdivided Populations. **Proc Nat Acad Sci** 70:3321-3323.

Oliveira KM et al. (2007) Functional integrated genetic linkage map based on EST-markers for a sugarcane (*Saccharum spp*.) commercial cross. **Molecular Breeding** 20:189–208.

Oliveira KM et al. (2009) Characterization of new polymorphic functional markers for sugarcane. **Genome** 209:191–209.

Oriolo FKMY (2016) Genotipagem molecular em acessos do Complexo *Saccharum* para uso no melhoramento genético de cana-de-açúcar. 48 f. Disssertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Instituto Biológico, São Paulo.

Perrier X, Jacquemoud-Collet (2006) J. **DARwin software**.

Pritchard J, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics** 155:945–959.

Schoen DJ, Brown AHD (1993) Conservation of allelic richness in wild crop relatives is aided by assessment of genetic markers. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 90:10623-7.

Silva JA (2017) The Importance of the Wild Cane *Saccharum spontaneum* for Bioenergy Genetic Breeding. **Sugar Tech** 1-39.

Silva JA et al. (2018) Agronomic and molecular characterization of wild germplasm *Saccharum spontaneum* for sugarcane and energycane breeding purposes. **Scientia Agricola** 75:329-338.

Singh RB et al. (2014) Importance and progresses of microsatellite markers in Sugarcane (*Saccharum spp*. hybrids). **Indian Journal of Sugar-cane Technology** 29:1–12.

Tai PYP, Miller JD (2001) A Core Collection for *Saccharum spontaneum L.* from the World Collection of Sugarcane. **Crop Science** 41:879–88.

Xia J et al. (2009) MetaboAnalyst: a web server for metabolomic data analysis and interpretation. **Nucleic Acids Research** 37: 652-60.

CAPÍTULO III: Avaliação dos atributos tecnológicos de acessos do Complexo *Saccharum* e obtenção de uma coleção nuclear.

1. Introdução

A cana-de-açúcar possui grande representatividade na segurança alimentar e é responsável por aproximadamente 75% do suprimento de açúcar mundial, só o Brasil sendo responsável por 31,35 milhões de toneladas na última safra (CONAB, 2019). Além do âmbito alimentar, seus subprodutos são muito importantes na segurança energética, produzindo biocombustíveis e energia elétrica.

Atualmente, a produção da cana-de-açúcar no Brasil é de 625,2 milhões de toneladas (CONAB, 2019), com previsões de aumento para as próximas safras. O incremento da produtividade se deve, principalmente, ao melhoramento genético, que desenvolve cultivares mais produtivas e adaptadas aos diversos ambientes, não priorizando apenas a expansão da área de produção, mas cultivando os genótipos que melhor expressem seu potencial para cada tipo de ambiente (Landell e Bressiani, 2008).

O primeiro passo para o desenvolvimento de uma nova cultivar é o processo de hibridação, que visa ampliar a variabilidade genética, que será analisada nas próximas etapas (Landell e Bressiani, 2010). Esta etapa é crucial, dado que uma cultivar leva pelo menos 10 anos para ser lançada (Dal-Bianco et al., 2012), por isso, é necessário que os bancos de germoplasma possuam variabilidade genética consideravelmente alta, e que a escolha de genitores seja feita de maneira correta (Shrivastava et al., 2016).

Em um banco de germoplasma de cana-de-açúcar, além da necessidade de existência de híbridos comerciais e pré-comerciais que são utilizados com grande frequência na obtenção de novas cultivares comerciais (Landell e Bressiani, 2010), deve existir acessos das diversas espécies do Complexo *Saccharum*, que também poderão fornecer subsídios ao programa de melhoramento genético, seja para geração de cultivares de cana-energia, ou introgressão de características de interesse.

Cada espécie do gênero *Saccharum* possui características inerentes à que podem contribuir, seja no incremento de fibra, sacarose, rusticidade,

resistência às doenças (Shrivastava et al., 2016). Desse modo, a avaliação dos acessos de um banco de germoplasma incluem caracterização dos atributos de qualidade, para melhor conhecimento da variabilidade, estabelecimento de possíveis genitores e identificação de candidatos para introgressão genética.

Atributos tecnológicos, como Pol da cana corrigido (PCC), Teor de Fibra, Teor de sólidos solúveis (Brix), Porcentagem de açúcares redutores (AR%) e Pureza do caldo (Q), são utilizados pelos programas de melhoramento genético em pelo menos uma das fases como critério de seleção. Além do melhoramento genético em si, estes atributos são mensurados pelas usinas de açúcar e álcool, o qual deve garantir a qualidade da matéria-prima que chega para o beneficiamento para que satisfaça as exigências industriais.

A medida Brix representa a porcentagem de sólidos solúveis contidos em uma solução de sacarose quimicamente pura. Esta medida está relacionada com o teor de sacarose, mas também com de outras substâncias presentes em uma solução, como proteínas, sais, ácidos, etc. O atributo AR% é referente à quantidade de açúcares redutores presente no caldo. O atributo Pol da cana corrigido ou Pol da cana (PCC) fornece uma medida mais exata do teor de sacarose, e é uma das principais características, já que se almeja uma maior tonelada de pol por hectare (TPH). A pureza do caldo está diretamente relacionada com a qualidade da matéria-prima, pois fornece uma medida da quantidade de açúcar recuperável que existe. Portanto, industrialmente é essencial que se tenha um alto grau de pureza (Consecana, 2012).

O teor de fibra da cana corresponde à parcela insolúvel do colmo representado pela celulose, hemicelulose, lignina, etc (Consecana, 2012). É calculado a partir do brix do caldo, PBU (peso do bolo úmido) e PBS (peso do bolo seco). Algumas espécies do gênero *Saccharum*, como *S. spontaneum* possuem uma maior quantidade de fibra (Silva, 2017). Um alto teor de fibra não é o desejável pela indústria como critério de alta qualidade de matéria-prima, e altos teores desses componentes podem não ser processados pelo maquinário de uma usina. Na obtenção de cultivares comerciais, também não é um atributo desejado, porém, os melhoristas têm dado maior atenção à esta característica para obtenção de cultivares de cana-energia, devido ao valor que a biomassa representa (Matsuoka et al., 2014).

Os bancos de germoplasma, especialmente do gênero *Saccharum* e correlatos, possuem um grande número de acessos, e consequentemente, de variabilidade, o que torna quase inviável a caracterização de todos os acessos. Uma estratégia para a melhor exploração dos recursos genéticos é o desenvolvimento de uma coleção nuclear, que tem a função de resumir a variabilidade genética de um grande número de genótipos, permitindo que os recursos genéticos sejam melhor explorados. O intuito da obtenção de uma coleção nuclear é eliminar o máximo de redundância sem que haja perda de variabilidade, ou seja, de modo que a representatividade seja mantida (Nayak et al., 2014). Diversas coleções nucleares de espécies do gênero *Saccharum* foram obtidas a partir de dados quantitativos (Balakrishnan, 2000; Todd et al., 2014; Shadmehr et al., 2017; Silva et al., 2018).

Deste modo, a análise quanto aos atributos tecnológicos é um processo imprescindível no melhoramento genético da cana-de-açúcar, seja para a escolha dos melhores genitores no processo de hibridação, caracterização para introgressão genética ou caracterização da variabilidade existente. O presente estudo teve como objetivo analisar acessos de diferentes espécies do Complexo *Saccharum,* pertencentes ao Banco de Germoplasma do IAC – Centro de Cana quanto a seus atributos tecnológicos, os quais foram utilizados na organização de uma coleção nuclear.

2. Material e métodos

2.1. Material vegetal

No total, foram avaliados 163 genótipos do Banco de Germoplasma do Programa de Melhoramento Genético de Cana-de-Açúcar do Instituto Agronômico de Campinas pertencentes às espécies do gênero *Saccharum* e gêneros correlatos, como *Erianthus*. Deste total, 38 são acessos de *S. officinarum,* 38 *S. spontaneum,* 13 *S. barberi,* 7 *S. robustum,* 7 *S. sinense*, 51 híbridos e 9 são acessos do gênero *Erianthus.* Estes acessos foram importados da Coleção Mundial de Cana-de-açúcar "World Sugarcane and Related Grasses Collection" do USDA/ARS - United States Department of Agriculture/

Agricultural Research Service, localizada em Miami, FL, EUA. Alguns destes genótipos (30) são os mesmos que foram caracterizados através de marcadores moleculares microssatélites no capítulo anterior. Os dados referentes às análises tecnológicas destes acessos foram cedidos pela empresa GranBio, (Dr. José Antônio Bressiani).

Tabela 1: Acessos utilizados neste estudo e suas respectivas espécies.

Acesso	Espécie	Acesso	Espécie
05-95	*Erianthus*	DON CICO	*S. officinarum*
11-95	*Erianthus*	F159	*S. officinarum*
13-95	*Erianthus*	F160	*S. officinarum*
E282	*Erianthus*	HEMJA	*S. officinarum*
IK76-340	*Erianthus*	IJ76-414	*S. officinarum*
IS76-149	*Erianthus*	IJ76-435	*S. officinarum*
UNKNOWN (9 - 28)	*Erianthus*	IN84-045	*S. officinarum*
UNKNOWN (R16)	*Erianthus*	ISD25	*S. officinarum*
US63-052	*Erianthus*	ISD29	*S. officinarum*
7628	Hibrido	KHAM	*S. officinarum*
AGAUL	Hibrido	KT730	*S. officinarum*
AGOULE	Hibrido	M99/34	*S. officinarum*
AKOKI 22	Hibrido	NCO029	*S. officinarum*
ANOMAN	Hibrido	NG28-285	*S. officinarum*
APELE 50	Hibrido	NG57-076	*S. officinarum*
AZUL DE CASA	Hibrido	NG77-042	*S. officinarum*
B359	Hibrido	NG77-084	*S. officinarum*
B37161	Hibrido	OLD JAVA	*S. officinarum*
B60267	Hibrido	PADANGSCHE DARK RED	*S. officinarum*
B69691	Hibrido	PB52-1-1	*S. officinarum*
B70713	Hibrido	PMAG84-02	*S. officinarum*
BLACK INNES	Hibrido	POJ2725	*S. officinarum*
CO1148	Hibrido	POJ2878	*S. officinarum*
CO6806	Hibrido	PR980	*S. officinarum*
CO727	Hibrido	PREANGER GREEN STRIPED	*S. officinarum*
COMUS	Hibrido	R397	*S. officinarum*
CP70-1133	Hibrido	R45PT107	*S. officinarum*
DB420/60	Hibrido	UALALEHU	*S. officinarum*
F148	Hibrido	UM68-015	*S. officinarum*
F177	Hibrido	21NG3 SEED	*S. robustum*
F31-436	Hibrido	IS76-138	*S. robustum*
F31-762	Hibrido	NG28-289	*S. robustum*
FIJI 1	Hibrido	NG57-055	*S. robustum*
H32-8560	Hibrido	NG77-021	*S. robustum*
HO95-988	Hibrido	NG77-049	*S. robustum*
IJ76-236	Hibrido	T45924-43	*S. robustum*

IN76-234	Hibrido	CHINA	*S. sinense*
ISD254 / T42931476	Hibrido	MANKIA	*S. sinense*
LOUJE	Hibrido	NEPAL 3	*S. sinense*
M147/44	Hibrido	TEKCHA CHIKI ISLAND	*S. sinense*
M2350/79	Hibrido	TEKCHA CHUNG TSENG	*S. sinense*
MOL6077	Hibrido	TEKCHA OKINAWA	*S. sinense*
N37	Hibrido	UBA NAQUIN	*S. sinense*
NCO339	Hibrido	06-95	*S. spontaneum*
NG28-055	Hibrido	08-95	*S. spontaneum*
NG57-030	Hibrido	19-95	*S. spontaneum*
NG57-062	Hibrido	BARBADOS WHITE SPORT	*S. spontaneum*
NG57-208	Hibrido	CPDAU84-9678	*S. spontaneum*
NG77-055	Hibrido	DESI PANDA	*S. spontaneum*
NG77-196	Hibrido	DESI PAUNDA	*S. spontaneum*
PAUNRA	Hibrido	H51-9001	*S. spontaneum*
POJ2753	Hibrido	HOLES 1	*S. spontaneum*
RSB90-22	Hibrido	IA3107	*S. spontaneum*
SPAANSCH	Hibrido	IK76-072	*S. spontaneum*
SUNNABILE	Hibrido	IN84-012 F14	*S. spontaneum*
T44632-391 A	Hibrido	IND81-136	*S. spontaneum*
TIMOR WILD	Hibrido	IND81-170	*S. spontaneum*
UNKNOWN (21-10)	Hibrido	IND81-191	*S. spontaneum*
US57-003-03	Hibrido	LOUCANE	*S. spontaneum*
US57-159-13	Hibrido	MISCANTHUS	*S. spontaneum*
B73385	*S. barberi*	MOL4503	*S. spontaneum*
DARK PINDARIA	*S. barberi*	MOL6427	*S. spontaneum*
GANAPATHY	*S. barberi*	MOL6446	*S. spontaneum*
MANGWA	*S. barberi*	N26-14	*S. spontaneum*
MESANGEN	*S. barberi*	NA56-79	*S. spontaneum*
MIALAN	*S. barberi*	NCo310	*S. spontaneum*
NG77-122	*S. barberi*	NG57-238	*S. spontaneum*
NH70-015	*S. barberi*	Q46127	*S. spontaneum*
PURI	*S. barberi*	Q46394	*S. spontaneum*
ROUNDA	*S. barberi*	Q47125	*S. spontaneum*
SEMARI	*S. barberi*	Q47126	*S. spontaneum*
TERERU	*S. barberi*	Q47127	*S. spontaneum*
UBA IPORANGA	*S. barberi*	Q47128	*S. spontaneum*
43-167	*S. officinarum*	S.KANASHIROI	*S. spontaneum*
BS-3058	*S. officinarum*	S.SPONT 14095	*S. spontaneum*
CG97-100	*S. officinarum*	S.SPONT 8489	*S. spontaneum*
CP45-1198	*S. officinarum*	SES004A	*S. spontaneum*
CP73-1547	*S. officinarum*	SES011	*S. spontaneum*
CPCL99-1401	*S. officinarum*	SES091	*S. spontaneum*
CPR1XP1	*S. officinarum*	SES220	*S. spontaneum*
CR67400	*S. officinarum*	US56-151	*S. spontaneum*
D158/41	*S. officinarum*		

2.2. Análise tecnológica

Os atributos tecnológicos analisados pela empresa GranBio foram: Pol da cana corrigido (PCC), Teor de sólidos solúveis (Brix), Porcentagem de açúcares redutores (AR%), Pureza do caldo aparente (Q) e Teor de fibra. Estes parâmetros são muito importantes, pois estão relacionados com a quantidade de açúcares totais recuperáveis (ATR) contida no caldo, que por sua vez, determinará a qualidade e o valor da matéria-prima. No tocante ao melhoramento genético, estes atributos constituem um critério para algumas das fases de seleção, além de, junto à outras características, determinarem a escolha de genitores para o desenvolvimento de híbridos superiores.

As análises foram efetuadas pela GranBio, após 10 meses de plantio, de acordo com os métodos descritos no Manual de instruções Consecana (2012), que segue as normas da ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas.

O teor de fibra foi determinado pelo método da prensa hidráulica original (Tanimoto, 1964), onde o cálculo é realizado a partir do Brix do caldo, PBU (peso do bolo úmido) e PBS (peso do bolo seco). O teor de sacarose (PCC) foi calculado a partir da equação: PC = S x (1-0,01 F) x C, onde:

S= Pol do caldo extraído

F= Teor de fibra

C= fator de correção do Pol extraído do caldo em Pol do caldo absoluto

A quantidade de sólidos solúveis (Brix) foi analisada através de refratômetro digital. Esta medida corresponde ao teor de sacarose aparente em uma solução impura, que contém outras substâncias dissolvidas. A porcentagem de açúcares redutores (AR%) foi obtida através do método de cálculo em função da pureza**.** A pureza do caldo (Q) reflete a quantidade de sacarose em relação ao Brix. É calculada através da equação: Q= (Pol/Brix) x 100. A pureza está relacionada com a quantidade de açúcar recuperável.

2.3. Estatística descritiva

Os dados dos acessos foram obtidos de touceiras individuais mantidas em vasos de 50 litros à campo e disponibilizados pela empresa GranBio.

Acessos da espécie *Saccharum spontaneum* devem ser mantidos desta forma por ser uma espécie invasiva. Para cada atributo tecnológico foi obtido as estatísticas descritivas média, variância, desvio padrão, e coeficiente de variação bem como a correlação entre os atributos. A fim de verificar se os dados referentes as variáveis analisadas apresentavam distribuição Normal, os mesmos foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk com nível de significância de 5% (p-valor=0,005). A Análise de Componentes Principais (PCA) foi realizada com todas as variáveis de atributos tecnológicos através do software MetaboAnalyst (Xia et al., 2009).

2.4. Obtenção de uma coleção nuclear

A coleção nuclear foi implementada através do software PowerCore (Kim et al., 2007) utilizando os dados de todas as variáveis quantitativas de atributos tecnológicos. Este software utiliza a estratégia de maximização (M), função mais poderosa na eliminação de redundância utilizada na obtenção de coleções nucleares, e o algoritmo heurístico modificado, que visa reduzir ao máximo o número de entradas de uma coleção nuclear mantendo a diversidade original. Este software tem sido largamente utilizado para obtenção de coleções nucleares a partir de dados moleculares e quantitativos.

3. Resultados

3.1. Distribuição dos dados

Os parâmetros de estatística descritiva, como média, variância, coeficiente de variação (CV), valores máximos e mínimos obtidos para os atributos Brix (teor de sólidos solúveis), PCC (pol da cana corrigido), AR% (porcentagem de açúcares redutores), teor de fibra, e pureza do caldo (Q), estão representados na Tabela 2. O atributo pureza do caldo apresentou os maiores valores para média (65,5) e variância (285,8) e o menor CV (25%), enquanto a variável AR%, apresentou os menores valores de média (1,26) e variância (0,34). O maior CV foi obtido pela variável PCC (54%).

O acesso HO95-988, híbrido, apresentou os maiores valores para Brix (21,10%) e PCC (13,95), já para AR (3,36%), teor de fibra (47,35%), e pureza do caldo (89,22%), os acessos NG57-076, pertencente à espécie *S. officinarum*, Q47125, pertencente à *S. spontaneum* e POJ2878 pertencente à *S. officinarum*, respectivamente, apresentaram os maiores valores.

Os menores valores para as variáveis Brix, PCC, AR%, fibra e pureza do caldo (Q) foram obtidos, respectivamente, pelos acessos 13-95 (Brix = 4,70%) *Erianthus kueni*, IND81-170 (PCC = 0,54 %) *S. spontaneum,* HO95-988 (AR = 0,20%) híbrido, NG57-076 (Fibra = 10,53%) *S. officinarum,* IND81-170 (Q = 12,94%) *S. spontaneum*.

Os atributos tecnológicos também foram analisados para cada espécie separadamente (Tabela 3). *S. officinarum* apresentou o maior valor de Brix (13,5%), PCC (8,1) e pureza do caldo (76%). *S. spontaneum* obteve o maior valor de fibra (28,8%), ligeiramente maior que *Erianthus* (28,5%), e *S. sinense* o maior valor de AR (1,7%). Os menores valores das médias de Brix (6,0%), PCC (2,3), AR (1,1%) e pureza do caldo (45,76%) foram encontrados em acessos de *Erianthus* spp., sendo que *S. spontaneum* obteve o mesmo valor de AR%. *S. officinarum* deteve o menor valor para o teor de fibra (16,4%).

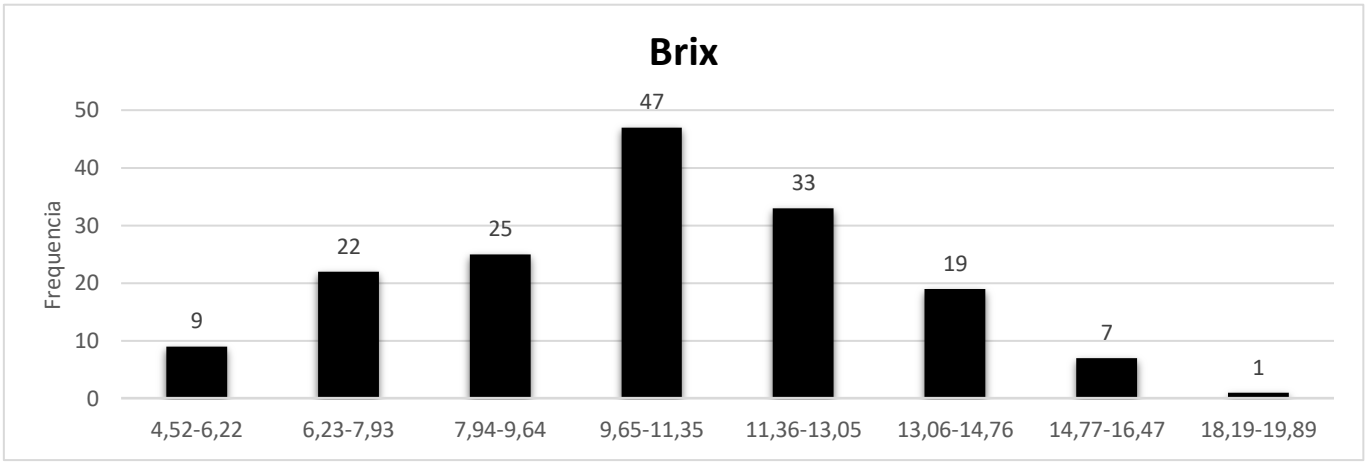
Todas as variáveis apresentaram distribuição heterogênea dos dados. Os histogramas para cada variável são apresentados na Figura 1. Nenhuma das variáveis apresentaram distribuição Normal segundo o teste de Shapiro-Wilk com 5% de significância.

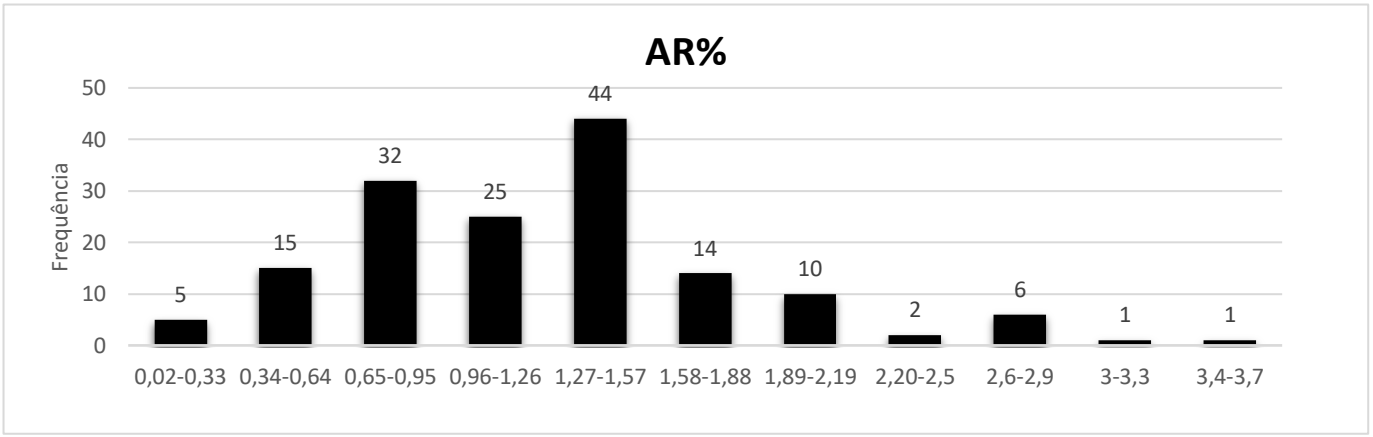
Tabela 2: Valores máximo e mínimo, média, variância e CV (coeficiente de variação) para os atributos Brix, PCC, fibra e AR% obtidos pela empresa GranBio para os 163 acessos.

	Brix	**PCC**	**Fibra**	**AR%**	**Pureza do caldo**
Valor máximo	21,10	13,95	47,35	3,36	42,91
Valor mínimo	4,4	0,54	10,53	0,2	12,94
Media	11,36	5,96	21.31	1,26	65,50
Variância	11,42	10,6	57,26	0,34	285,8
CV	29%	54%	35%	44%	25%

Tabela 3: Média dos atributos Brix (teor de sólidos solúveis), PCC (Pol da cana), AR% (açúcares redutores), fibra e pureza do caldo dentro de cada espécie dos 163 acessos analisados e o coeficiente de variação (CV%) de cada variável.

Espécie	BRIX	PCC	AR%	FIBRA	Pureza do caldo
Erianthus spp.	6,8	2,3	1,1	28,5	45,76
Híbridos	12,6	7,3	1,2	18,1	72,77
S. barberi	11,8	6,1	1,5	19,4	68,80
S. officinarum	13,5	8,1	1,3	16,4	76
S. robustum	9,0	3,3	0,8	27,7	56,92
S. sinense	12,1	6,5	1,7	17,3	69,85
S. spontaneum	8,6	3,0	1,1	28,8	49,53
CV%	29%	54%	35%	44%	25%





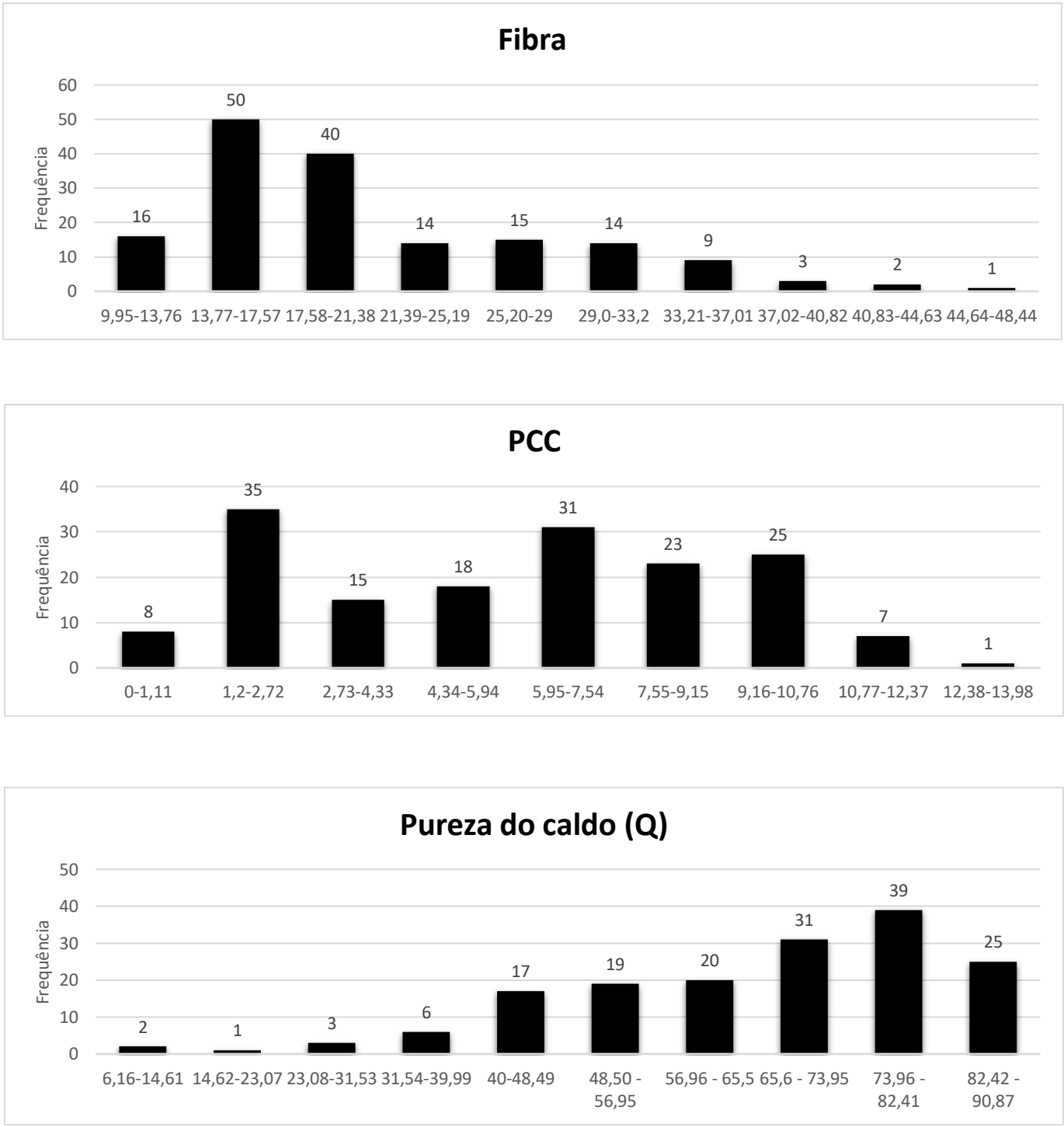


Figura 1: Histograma das variáveis Brix (teor de sólidos solúveis), AR% (porcentagem de açúcares redutores), Fibra, PCC (Pol da cana corrigido), Pureza do caldo (Q) e nos 163 acessos avaliados. A quantidade de acessos contidos em cada classe está representada acima das barras.

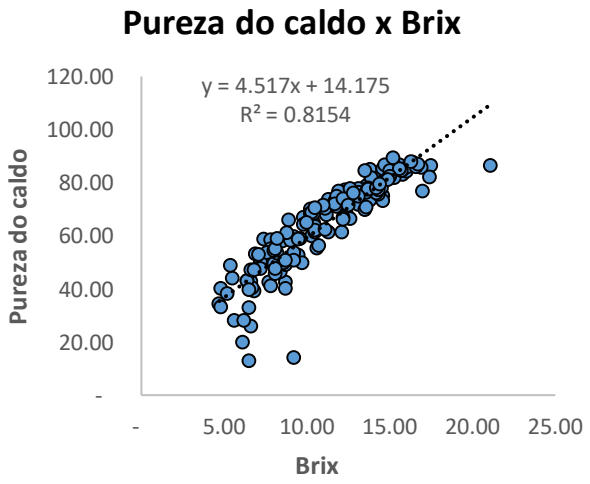
3.2. Dispersão e correlação entre atributos tecnológicos

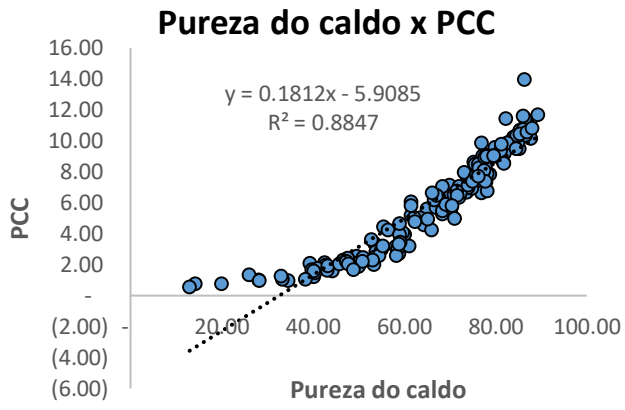
A correlação e dispersão entre todos os atributos tecnológicos são apresentados na Tabela 4 e Figura 2, respectivamente. Os atributos Brix e Pol da cana corrigido (PCC) e pol da cana corrigido (PCC) e pureza do caldo (Q) apresentaram os maiores valores de correlação positiva, 0,96 e 0,94 respectivamente, enquanto o maior valor negativo (-0,72), indicando uma forte correlação negativa, foi obtido entre fibra e PCC.

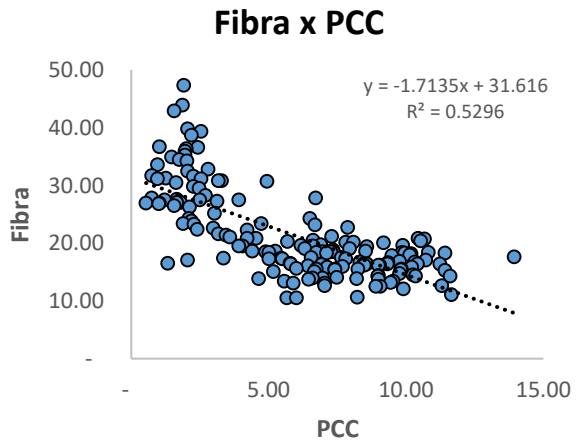
Tabela 4. Valores de correlação obtidos entre os atributos tecnológicos.

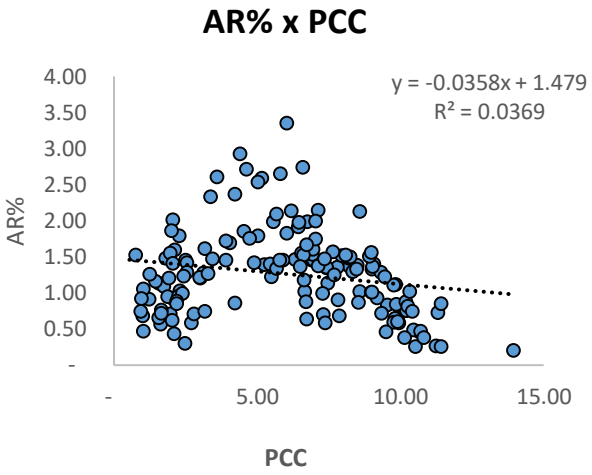
	Brix	**AR%**	**PCC**	**Fibra**	**Pureza do caldo**
Brix	1,0	0,17	0,96	-0,6	0,9
AR	0,17	1,0	-0,43	-0,5	-0,18
PCC	0,96	-0,43	1,0	-0,72	0,94
Fibra	-0,6	-0,25	-0,72	1,0	-0,6
Pureza do caldo	0,9	-0.18	0,94	-0,6	1,0

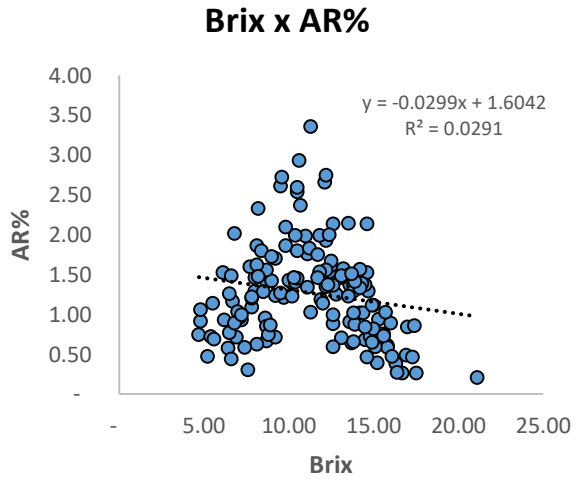
De acordo com a dispersão entre os atributos tecnológicos (Figura 2), os atributos Brix e fibra, e PCC e fibra mostram-se como esperado, inversamente correlacionados. De acordo com a equação da reta, espera-se para cada aumento unitário de Brix, um decréscimo de -1.38 no valor de fibra (variável do eixo y), assim como para cada aumento unitário de PCC espera-se um decréscimo de -1.71 no valor de fibra (variável do eixo y).

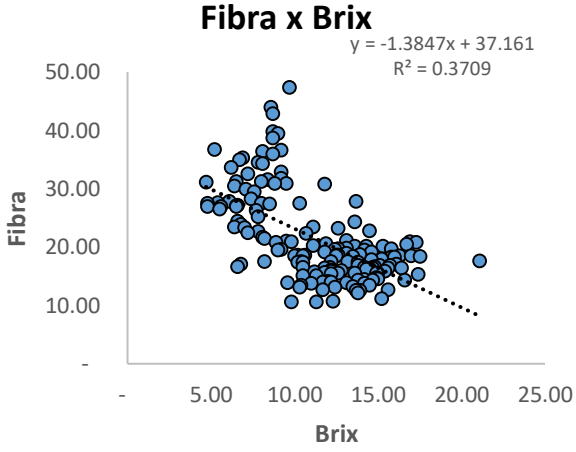


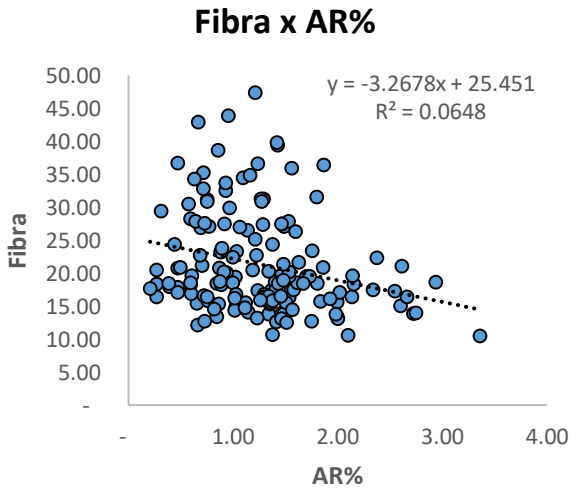


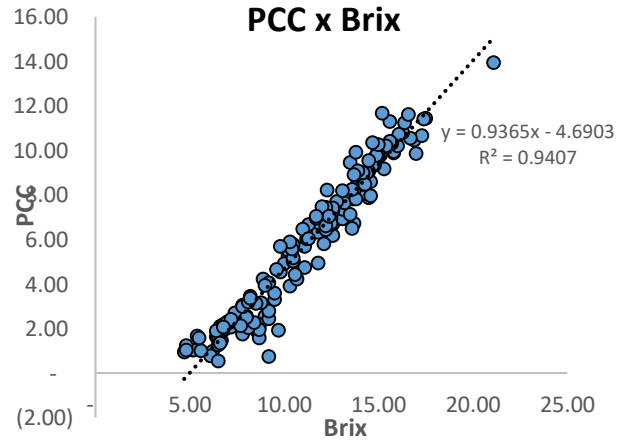

Fibra x PCC
y = -1.7135x + 31.616
R² = 0.5296
Fibra
PCC
50.00
40.00
30.00
20.00
10.00
-
5.00
10.00
15.00


AR% x PCC
y = -0.0358x + 1.479
R² = 0.0369
AR%
PCC
4.00
3.50
3.00
2.50
2.00
1.50
1.00
0.50
-
5.00
10.00
15.00


Brix x AR%
y = -0.0299x + 1.6042
R² = 0.0291
AR%
Brix
4.00
3.50
3.00
2.50
2.00
1.50
1.00
0.50
-
5.00
10.00
15.00
20.00
25.00


Fibra x Brix
y = -1.3847x + 37.161
R² = 0.3709
Fibra
Brix
50.00
40.00
30.00
20.00
10.00
-
5.00
10.00
15.00
20.00
25.00


Fibra x AR%
y = -3.2678x + 25.451
R² = 0.0648
Fibra
AR%
50.00
45.00
40.00
35.00
30.00
25.00
20.00
15.00
10.00
5.00
-
1.00
2.00
3.00
4.00


PCC x Brix
y = 0.9365x - 4.6903
R² = 0.9407
PCC
Brix
16.00
14.00
12.00
10.00
8.00
6.00
4.00
2.00
-
(2.00)
5.00
10.00
15.00
20.00
25.00

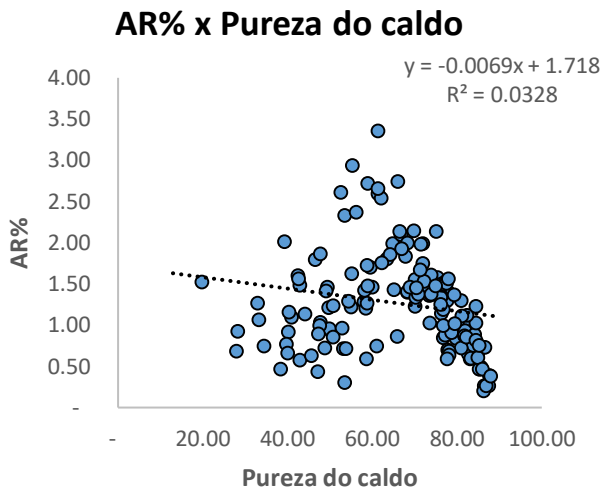


Figura 2: Dispersão dos atributos tecnológicos correlacionados Pureza do caldo x Brix; Pureza do caldo x PCC; Fibra x PCC; AR% x PCC; Brix x AR%; Fibra x Brix; Fibra x AR%; AR% x Pureza do caldo; PCC x Brix; com respectiva equação da reta, e R^2.

3.3. Análise de componentes principais

De acordo com os resultados obtidos pela análise de componentes principais, os dois primeiros componentes somados (PC1 e PC2) explicaram quase a totalidade da variação entre os acessos. O PC1 explicou 91,1% da variação, enquanto o PC2 8%. Os acessos de *S. spontaneum* foram os mais espalhados entre os grupos, refletindo a maior diversidade desta espécie. Os acessos de *Erianthus* e *S. robustum* sobrepuseram-se aos de *S. spontaneum,* já os acessos pertencentes à *S. officinarum*, *S. sinense*, *S. barberi* e também os Híbridos, formaram um grupo mais coeso, refletindo às características similares das diferentes espécies.

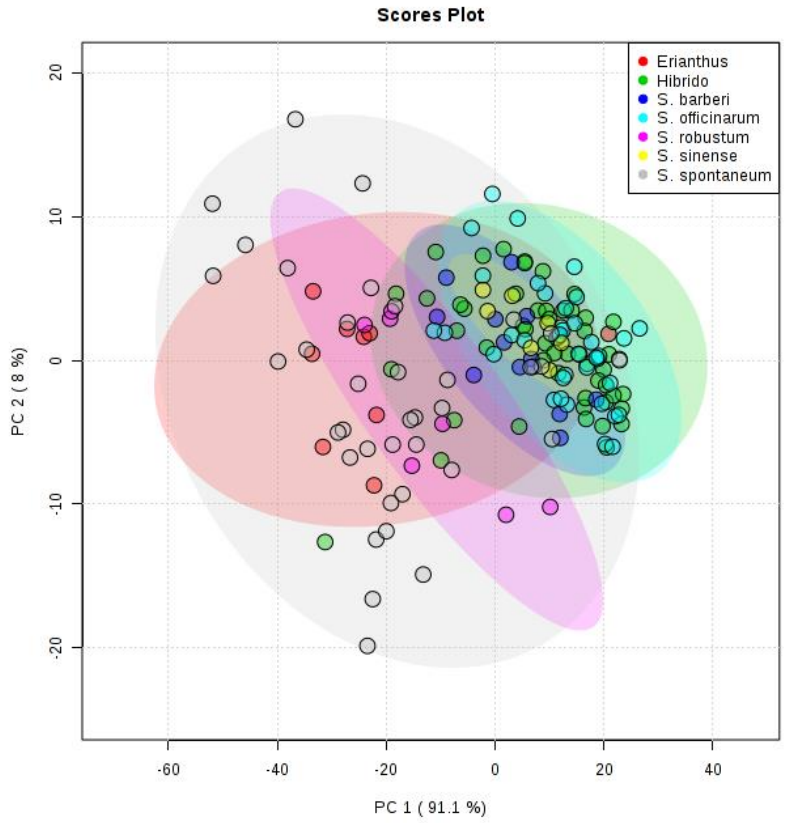


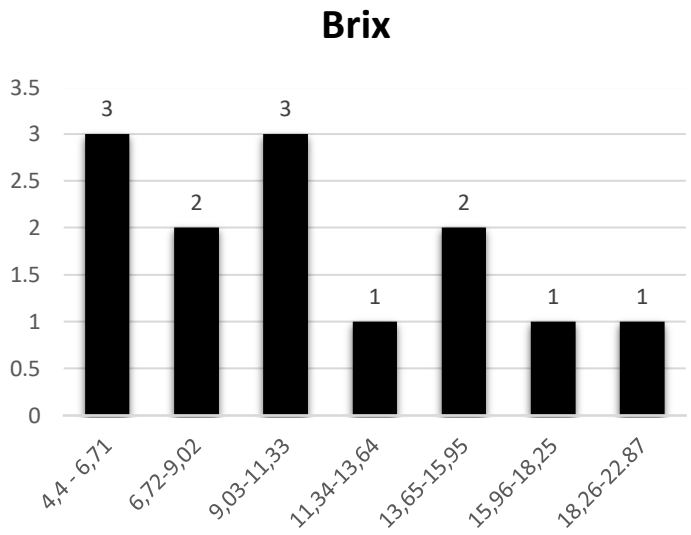
Figura 3: Análise de Componentes Principais realizada pelo software Metaboanalyst com base nos cinco atributos tecnológicos (Brix, Fibra, AR%, PCC e Q).

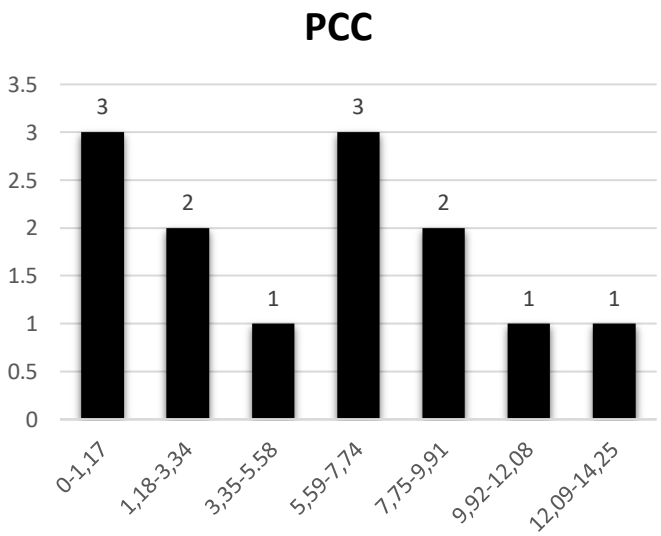
3.4. Coleção nuclear

A coleção nuclear estabelecida a partir dos dados dos atributos tecnológicos dos 163 acessos analisados foi reduzida a 13 acessos, o que representa aproximadamente 20% da coleção original. Composta por *Erianthus* spp.*, S. officinarum, S. barberi, S. spontaneum* e Híbridos (Tabela 5) esta coleção representa a variabilidade total dos acessos estudados. Com a finalidade de comprovar se, de fato, a coleção nuclear obtida representa a variabilidade fenotípica para os tributos tecnológicos dos acessos originais, foram calculados parâmetros de estatística descritiva, como média, mediana, valor máximo, e variância, de ambas as coleções (coleção total contendo os 163 genótipos, e coleção nuclear). Para melhor representação da distribuição, e comparação com o conjunto dos 163 acessos, gráficos de distribuição foram construídos para cada variável da coleção nuclear (Figura 4).

Tabela 5: Coleção nuclear obtida a partir dos 163 acessos, contendo os respectivos valores de atributos tecnológicos, bem como as respectivas espécies.

Nome do acesso	Espécie	Brix	Pureza do caldo	PCC	AR%	Fibra
US63-052	*Erianthus* spp.	5.2	38.33	1.04	0.47	36.68
KT730	*S. officinarum*	10.7	56.3	4.23	2.37	22.32
Don Cico	*S. officinarum*	9.8	66.83	5.68	2.1	10.6
Tereru	*S. barberi*	12.2	66.11	6.6	2.75	13.95
NG77-042	*S. officinarum*	17.4	82.17	11.42	0.86	15.33
PB52-1-1	*S. officinarum*	14.3	77.37	8.09	1.53	20.16
IND81-17	*S. spontaneum*	6.5	12.94	0.54	-	26.96
POJ2725	*S. officinarum*	15	82.41	9.84	1.12	15.5
Q47126	*S. spontaneum*	9	58.26	2.56	1.42	39.43
HO95-988	*Híbrido*	21.1	86.32	13.95	0.2	17.64
NG57-076	*S. officinarum*	11.3	61.43	6.03	3.36	10.53
UNKNOWN (21-10)	*Erianthus* spp.	8.7	40.09	1.56	0.66	42.89
S. kanashiroi	*S. spontaneum*	6.2	28.21	0.97	0.93	33.65





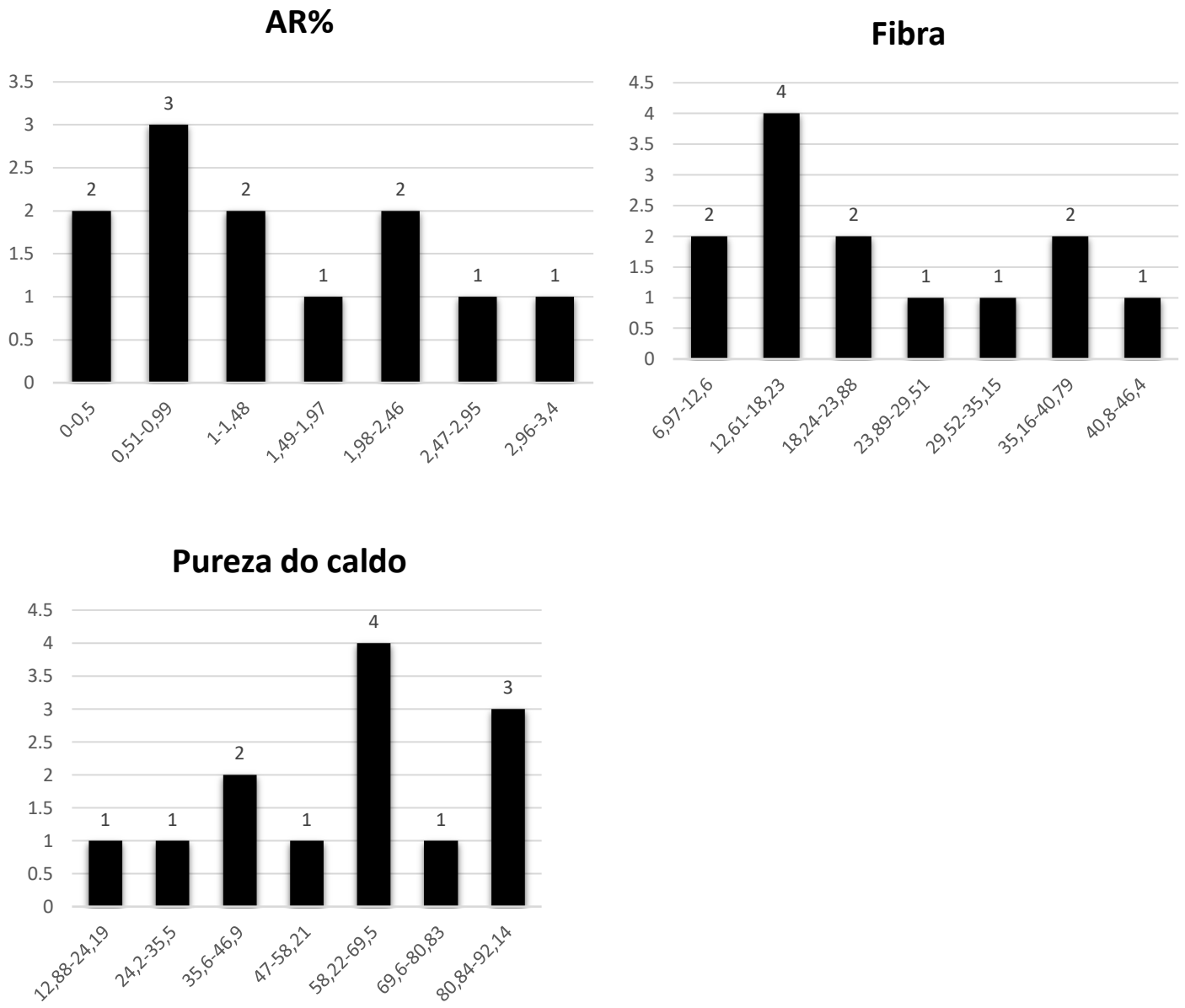


Figura 4: Gráficos de distribuição das variáveis referentes aos 13 acessos que compõe a coleção nuclear. A quantidade de acessos contidos em cada classe está representada acima das barras.

Os resultados presentes na Tabela 6 confirmam a representatividade da coleção nuclear, com valores de média de alguns atributos tais como AR (1,48%) e fibra (23,51%) maiores que o da coleção total (1,26% e 21,31%). Os valores máximos para cada variável tenderam a ser mantidos na coleção nuclear, como é observado no Brix (21,1%), PCC (13,95%) e AR (3,36%). Os valores da mediana foram bem próximos entre os dois conjuntos de dados, e a variância foi significativamente maior na coleção nuclear. Além dos parâmetros descritivos, o

software PowerCore fornece índices relativos entre as duas coleções: Índice de eficiência (ID): 0,65; Porcentagem média de diferença (MD%): 11,45; Taxa de coincidência (CR%): 96,21; Porcentagem de diferença de Variação (VD%):50,51; Taxa variável (VR%): 142,41. O cálculo para cada índice envolve os dois conjuntos de dados analisados, e através dos resultados obtidos, é possível constatar que a coleção nuclear manteve a variabilidade da coleção original.

Tabela 6: Comparação das estatísticas descritivas entre os 163 acessos e a coleção nuclear concebida. Brix: teor de sólidos solúveis; Q: pureza do caldo; PCC: Pol da cana corrigido; AR: teor de açúcares redutores;

		Média	**Mediana**	**Máximo**	**Variância**
BRIX	Todos acessos	11,36	11,8	21,1	11,4
	Coleção nuclear	11,34	10,7	21,1	21,47
Q	Todos acessos	65,5	70,24	89,22	285,83
	Coleção nuclear	58,21	61,43	86,32	511,72
PCC	Todos acessos	5,96	6,4	13,95	10,6
	Coleção nuclear	5,58	5,68	13,95	18,68
AR	Todos acessos	1,26	1,26	3,36	0,34
	Coleção nuclear	1,48	1,27	3,36	1,04
FIBRA	Todos acessos	21,31	18,60	47,35	57,26
	Coleção nuclear	23,51	20,16	42,89	126,8

4. Discussão

4.1. Distribuição dos dados

No processo de obtenção de cultivares comerciais de cana-de-açúcar, seja na seleção de clones superiores ou genitores para hibridação, busca-se sempre genótipos com alto teor de Brix (teor de sólidos solúveis) e PCC (teor de sacarose), em contrapartida, teores muito elevados de fibra não são características desejáveis. Já na obtenção de cultivares de cana-energia, que vislumbram um maior acúmulo de biomassa, é imprescindível a seleção de genótipos com altos teores de fibra, e em segundo plano, de sacarose, variando de acordo com o tipo de cana-energia (Tew e Cobill, 2008). Por esta razão, é de

extrema importância a correta caracterização e conhecimento da variabilidade existente entre os acessos de um banco de germoplasma.

De acordo com a distribuição dos dados de cada atributo tecnológico separadamente foi possível observar uma clara heterogeneidade, em que se tratando de variabilidade, é desejável. Cada parâmetro descritivo analisado tende a variar de acordo com o conjunto de dados analisados, neste caso, de acordo com o CV (coeficiente de variação), uma medida relativa da variabilidade utilizada para comparar diferentes conjunto de dados. Os 163 genótipos tiveram uma maior variação no PCC (pol da cana corrigido), o que pode ser explicado por esta característica estar presente em níveis bem maiores em *S. officinarum* e nos híbridos*,* por exemplo, que estão presentes na análise em uma maior quantidade, e ser significativamente menor em acessos de *S. spontaneum* e *Erianthus* spp.*,* resultando em uma maior heterogeneidade em relação à média.

A maior média foi obtida para o atributo pureza do caldo (Q), e em contrapartida, o menor coeficiente de variação, sugerindo que esta variável possui maior homogeneidade dos dados. Como o estudo englobou diferentes espécies do gênero *Saccharum,* e cada espécie possui características específicas, é esperado que haja maior variância. A pureza do caldo está totalmente relacionada com a qualidade da matéria-prima que chega na indústria para ser beneficiada, e espera-se uma menor variação da mesma. Quanto maior o nível de pureza do caldo, maior a recuperação de açúcares, sendo que os valores aceitáveis de pureza do caldo pela indústria variam de Estado para Estado, porém, o valor mínimo aceitável pela unidade industrial é de 75% (Consecana, 2012). Considerando este limite estabelecido, apenas 34% dos genótipos analisados tiveram um valor mínimo de 75% de Pureza do Caldo, o que se justifica pelo fato de serem acessos selvagens não melhorados, ou seja, não serão processados pela unidade industrial.

Os acessos com maior conteúdo de fibra pertencem às espécies *S. spontaneum* e *Erianthus* spp. e os menores a *S. officinarum* e híbridos. O acesso que apresentou maior quantidade de fibra, Q47125 (*S. spontaneum*) e o que apresentou menor quantidade NG57-076 (*S. officinarum*) apresentaram valores de 47,35% e 10,35% respectivamente, refletindo uma grande amplitude. Esta diferença na quantidade de fibra é inerente às duas espécies, e é uma

característica que pode ser explorada de acordo com o objetivo de um programa de melhoramento, quer seja para o desenvolvimento de cultivares tradicionais ou de cana-energia. No processo de obtenção de híbridos de cana-energia é comum a utilização de acessos de *S. spontaneum* pelo conhecimento de seu alto teor de fibra (Silva et al.,2018).

O acesso HO95-988, híbrido, se destacou apresentando o maior valor para PCC (13,95), e Brix (21,10), já para fibra mostrou um teor de 17,64%, maior que o valor habitual (em torno de 13%), esperado para cultivares comerciais, (Tew e Cobill, 2008), e para a quantidade de açúcares redutores, o menor valor (0,2). Apenas com a observação atípica na classe dos híbridos dos conteúdos destes atributos foi possível constatar que este acesso é um híbrido complexo. HO95-988 é um híbrido desenvolvido pela "Louisiana Agricultural Experiment Station" da Universidade de Louisiana envolvendo as 5 principais espécies do gênero *Saccharum* (*S. officinarum, S. spontaneum, S. robustum, S. barberi* e *S. sinense*). Ele é oriundo do cruzamento entre CP 86-941 X US 89-12, no qual seus ancestrais foram desenvolvidos com a finalidade de aumentar a base genética da cana-de-açúcar, sendo liberado, no ano de 2004, apresentando teores de fibra, açúcar, e taxa de perfilhamento significativamente maiores que a principal cultivar da época LCP 85-384, tendo grande representatividade no melhoramento genético por possuir valores altos de características contrastantes (Tew et al., 2005).

Dentre as espécies estudadas, os acessos de *S. officinarum* apresentaram a maior média para o teor de sacarose (PCC). Esta espécie é conhecida por possuir os maios teores de açúcar do gênero *Saccharum* (D'Hont et al., 2002). A menor média para esta característica pertence à *Erianthus* spp., espécie conhecida por possuir altos teores de fibra e baixos de sacarose, o menor valor para PCC foi encontrado no acesso 13-95. *S spontaneum* também apresentou baixa média para PCC, e o menor valor (0,54) foi encontrado no acesso IND81-170. Acessos desta espécie tendem a possuir um menor teor de sacarose (Silva, 2017).

Para AR% o acesso que apresentou maior valor (3,36), NG57-076, pertence à espécie *S. officinarum*, sendo que a maior média para esta característica foi encontrada em *S. sinense*. Porém, observa-se que para este

atributo, nenhuma espécie predominou com altos teores. O mesmo é observado nos menores valores, os quais acessos das diversas espécies representam, não seguindo um padrão exato.

A análise de Componentes Principais teve 91,1% da variação explicada pelo PC1 e 8% explicada pelo PC2, o que significa que os dois componentes explicaram toda a variação entre os acessos. De acordo com o gráfico obtido, é possível observar a sobreposição de acessos de *S. spontaneum*, *Erianthus* spp. e *S. robustum* os quais encontram-se mais espalhados e mais distantes das outras espécies. Estas espécies possuem em comum a características de alta produção de biomassa, especialmente fibra (Silva, 2017). As espécies *S. officinarum, S. sinense, S. barberi* e os Híbridos se agruparam com maior sobreposição indicando as similaridades entre estas espécies quanto aos atributos analisados. A visualização através de dados agrupados facilita a escolha de genitores candidatos de acordo com as características desejadas (Dutra Filho et al., 2011).

4.2. Dispersão dos dados e correlação

A correlação entre variáveis pode variar de -1 à 1, podendo ser negativa perfeita ou perfeita positiva, o que significa que se uma aumenta, consequentemente a outra aumenta ou diminui, não necessariamente na mesma proporção, mas seguindo um padrão (Filho et al., 2009). Estudos de correlação entre os caracteres são muito importantes para a elucidação da influência de uma característica sobre a outra, especialmente nas fases de seleção (Brown, 1967; Jackson, 1994).

Entre as variáveis analisadas, as que possuíram maior correlação foram Brix (teor de sólidos solúveis) e pol da cana corrigido (PCC), com um valor de 0,96 (correlação muito forte). Resultados similares foram encontrados por Shadmehr et al. (2017) analisando acessos de *S. officinarum* quanto às variáveis agronômicas e suas correlações, onde as mesmas variáveis apresentaram forte correlação ($r=0,95$, $p<0,01$). Simeone et al. (2016) analisando o Brix e perfil de diferentes açúcares em sorgo, observaram que a característica que melhor se correlacionava com o Brix foi o teor de sacarose. De fato, estes dois atributos

apresentam correlação positiva, pois o Brix mensura o teor de sólidos solúveis de acordo com as mudanças de índice de refração (Consecana, 2006), e o PCC é a medida mais exata do teor de sacarose, que por sua vez, faz parte do teor de sólidos solúveis, constituindo de 70 a 90% do Brix (Papini-Terzi et al., 2009). O acesso que apresentou o maior valor para ambas variáveis foi HO95-988, mais uma vez, destacando a importância deste híbrido. O acesso IS76-149 (*Erianthus* spp.) apresentou os menores valores para estas características.

As variáveis pureza do caldo (Q) e pol da cana corrigido (PCC) também tiveram uma alta correlação (0,94), explicada pelo fato de que a pureza do caldo é calculada através da relação entre PCC e Brix (Consecana, 2012), portanto o valor de PCC tem influência direta no valor da pureza.

As variáveis PCC e fibra tiveram uma correlação negativa forte (r=-0,72). Brix e fibra tiveram uma correlação negativa moderada (r=-0,6). Apesar do Brix ter tido uma correlação negativa moderada com fibra, algumas vezes, esta variável pode apresentar uma falsa correlação positiva com fibra, sendo que o teor de sacarose é a medida mais exata para estabelecimento de correlação com Fibra (Brown, 1967). A correlação negativa entre o teor de sacarose e fibra é conhecida em cana-de-açúcar (Ming et al., 2006), e tende a ser mais forte em populações de melhoramento submetidas à pressão de seleção apenas para obtenção do máximo de açúcar, e o mínimo de fibra possível (Matsuoka et al., 2014). A correlação mais fraca foi encontrada entre os atributos Brix e AR%, similar aos resultados de Simeone et al. (2016) que encontrou uma correlação negativa entre esses atributos. Os atributos AR% e pol da cana corrigido (PCC), apesar de apresentarem moderada correlação negativa, não estão relacionados, ao passo que uma mensura a porcentagem de açúcares redutores, e o outro, o teor de sacarose.

4.3. Obtenção da coleção nuclear

Esforços no sentido de se obter coleções nucleares de espécies do gênero *Saccharum* a partir de dados quantitativos vêm sendo realizados (Balakrishnan, 2000; Silva et al., 2018). Neste estudo, os 163 genótipos, pertencentes à diferentes espécies apresentaram grande variabilidade frente aos

5 atributos analisados. A obtenção de uma coleção nuclear composta por um número menor de acessos, porém sem perder a representatividade da coleção inteira que lhe deu origem, torna mais fácil e aplicável a exploração dos acessos em programas de melhoramento genético, ou até mesmo em estudos de mapeamento associativo (Nayak et al., 2014; Varshney et al., 2005). A coleção nuclear aqui obtida foi composta por 13 acessos pertencentes às diferentes espécies, que representam 20% da coleção original. Shadmehr et al. (2017) também utilizaram a estratégia de obtenção de uma coleção nuclear frente à acessos de *Saccharum* spp*.* a qual, a partir de 13 dados morfológicos analisados em 253 acessos, obteve uma coleção nuclear representativa.

Alguns parâmetros devem ser calculados com a finalidade de comparar as duas coleções, para que comprove a efetividade de representação da coleção nuclear. Os parâmetros de estatística descritiva aqui calculados foram próximos, e em alguns casos maiores quando comparados com todos os acessos, comprovando que a coleção nuclear obtida foi capaz de manter a variabilidade. Resultados similares foram encontrados por Todd et al. (2014), onde aproximadamente 1200 acessos foram caracterizados fenotipicamente, e uma coleção nuclear de 300 acessos foi gerada e manteve as características de estatística descritiva da coleção original, comprovando sua representatividade.

Os índices comparativos entre os dois conjuntos de dados fornecidos pelo software PowerCore dizem respeito a quanto de variabilidade genética foi mantida, e à eficiência da coleção nuclear em representar o conjunto original de dados. Todos os índices obtidos apresentam valores que comprovam o êxito da coleção nuclear. A taxa de coincidência (CR%), índice que melhor reflete a eficiência da coleção nuclear, foi maior (96,21%) que a de 93,96% obtida por Shadmehr et al. (2017). É recomendado que este índice seja superior a 80% para fins de melhoramento genético (Hu et al., 2000). Em contrapartida, a Porcentagem média de diferença (MD%) foi menor (2,31%), do que a aqui obtida (11,45%). Os altos valores obtidos de Porcentagem de diferença de Variação (VD%): 50,51 e Taxa variável (VR%): 142,41 confirmam que a coleção nuclear incorporou grande porção da variabilidade presente na coleção original.

A obtenção de uma coleção nuclear, apesar de manter a variabilidade genética da coleção original, pode não deter genes de interesse inerentes à cada

espécie. Outro fato a ser levado em conta, é que a variabilidade sozinha não pode ser tomada como garantia de melhoria, a menos que os acessos possuam características de importância econômica (Gashaw, 2016). É importante ressaltar, que a coleção nuclear aqui obtida, apesar de ter mantido a variabilidade da coleção original composta pelos 163 acessos, não englobou acessos de todas as espécies contidas na coleção original. Entretanto, essa coleção nuclear pode ser um ponto de partida para permitir uma exploração inicial dos acessos de acordo com um objetivo específico, ou seja, quer a geração de híbridos superiores de cana-energia, cultivares comerciais ou mesmo a introgressão de características desejáveis.

5. Referências Bibliográficas

Almaraj VA et al. (2006) Constituting a Core Collection of *Saccharum spontaneum* L. and Comparison of Three Stratified Random Sampling Procedures. **Genetic Resources and Crop Evolution** 53:1563-572.

Balakrishnan R, Nair NV, Screenivasan TV (2000) A method for establishing a core collection of *Saccharum officinarum L.* germplasm based on quantitative-morphological data. **Genetic Resources and Crop Evolution** 47:1–9.

Brown AHD (1967) Correlation between Brix in juice and Fibre in Commercial Hybrid sugar cane populations**. Elsevier** 54-755.

CONAB. Acompanhamento da Safra Brasileira - Cana-de-açúcar– Safra 2018/19, quarto levantamento. p. 8, 2019.

Conselho dos produtores de cana-de-açúcar, açúcar e álcool do estado de São Paulo-SP (CONSECANA-SP), Normas operacionais de avaliação da qualidade da canade-açúcar. 5ª ed., Piracicaba, 2006. Acesso em 22 de Fevereiro de 2019.

Conselho dos produtores de cana-de-açúcar, açúcar e álcool do estado do Paraná (CONSECANA-PR), Manual de instruções. 3º ed., Curitiba, 2012. Acesso em 22 de Fevereiro de 2019.

Dal-Bianco M et al. (2012) Sugarcane improvement: How far can we go? **Current Opinion in Biotechnology** 23:265-270.

D'Hont A et al. (2002) Oligoclonal interespecific origin of 'North Indian' and 'Chinese' sugarcanes. **Chromosome Research** 10:253-262.

Dutra Filho et al. (2011) Aplicação de técnicas multivariadas no estudo da divergência genética em cana-de-açúcar. **Revista Ciência Agronômica** 42:185-192.

Filho DBF (2009) Desvendando os Mistérios do Coeficiente de Correlação de Pearson (r). **Revista Política Hoje**.

Frankel OH, Brown AHD (1984) Plant genetic resources today: a critical appraisal. In: Holden, J.H.W. and Williams, J.T. (eds). Crop Genetic Resources: Conservation and Evaluation 249–268.

Gashaw ET, Mekbib F, Ayana A (2016) Genetic Diversity among Sugarcane Genotypes Based on Qualitative Traits. **Advances in Agriculture** 7:8.

Hu J, Zhu J, Xu H (2000) Methods of constructing core collections by stepwise clustering with three sampling strategies based on the genotypic values of crops. **Theoretical and Applied Genetics** 101:264–268.

Jackson P (1994) Genetic relationships between attributes in sugarcane clones closely related to *Saccharum spontaneum*. **Euphytica** 79:101-108.

Kim KW et al. (2007) PowerCore: a program applying the advanced M strategy with a heuristic search for establishing allele mining sets. **Bioinformatics** 23:2155–2162.

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

Landell MGA, Bressiani J (2010) Melhoramento Genético, Caracterização e Manejo Varietal. In.: Dinardo-Miranda LL, Vasconcelos AC e Landell MGA (Eds) Cana-de-açúcar, Campinas Instituto Agronômico de Campinas, p. 101-155.

Matsuoka S et al. (2014) Energy Cane: Its Concept, Development, Characteristics, and Prospects. **Advances in Botany** 1-13.

Ming R et al. (2006) Sugarcane Improvement through Breeding and Biotechnology**. Plant Breeding Reviews** v.27.

Nayak SN et al. (2014) Promoting utilization of *Saccharum* spp. genetic resources through genetic diversity analysis and core collection construction. **PloS one** 9:10.

Papini-Terzi FS et al. (2005) Transcription Profiling of Signal Transduction-Related Genes in Sugarcane Tissues**. DNA Research** 12:27–38.

Shadmehr et al. (2017) Phenotypic Variability Assessment of Sugarcane Germplasm (*Saccharum officinarum* L.) and Extraction of an Applied Mini-Core Collection. **Agriculture** 7:55.

Shrivastava, AK, Srivastava S (2016) Diversity of the germplasm of *Saccharum* species and related genera available for use in directed breeding programmes for sugarcane improvement. **Current Science** 111:3.

Silva JA (2017) The Importance of the Wild Cane *Saccharum spontaneum* for Bioenergy Genetic Breeding. **Sugar Tech** 1-39.

Silva JA et al. (2018) Agronomic and molecular characterization of wild germplasm *Saccharum spontaneum* for sugarcane and energycane breeding purposes. **Scientia Agricola** 75:329-338.

Simeone MLF, Coelho LFD, Souza, EAS, Leal MCB, Parrella RAC (2016) Avaliação do Brix e Perfil de Açúcares em Diferentes Genótipos de Sorgo Sacarino. XXXI Congresso Nacional de Milho e Sorgo "Milho e Sorgo: inovações, mercados e segurança alimentar". Bento Gonçalves – RS.

Tanimoto T (1964) The press method of cane analysys. **Hawaiians Planter's Record** 133-150.

Tew et al. (2005) Registration of ‘Ho 95-988’ Sugarcane. **Crop Science** v.45.

Tew TL, Cobill RM (2008) Genetic improvement of sugarcane (*Saccharum* spp.) as an energy crop. In: W Vermerris (ed) **Genetic Improvement of Bioenergy Crops** 249–272.

Todd J et al. (2014) Phenotypic characterization of the Miami World Collection of sugarcane (*Saccharum* spp.) and related grasses for selecting a representative core. **Genetic Resources and Crop Evolution** 1-16.

Varshney RK, Graner A, Sorrells ME (2005) Genic microsatellite markers in plants: features and applications. **Trends in Biotechnology** 23:48–55.

Xia J et al. (2009) MetaboAnalyst: a web server for metabolomic data analysis and interpretation. **Nucleic Acids Research** 37:652-60.