



Genotipagem molecular de acessos da Coleção Mundial de Cana-de-açúcar e Gramíneas Correlatas, com aplicações na obtenção de variedades com elevada concentração de biomassa e resistência a fatores bióticos e abióticos

Fernanda Keiko Martins Yamauchi Oriolo

Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo
Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios
Instituto Biológico
Programa de Pós-Graduação em Sanidade, Segurança Alimentar e
Ambiental no Agronegócio

Genotipagem molecular de acessos da Coleção Mundial de Cana-de-açúcar e Gramíneas Correlatas, com aplicações na obtenção de variedades com elevada concentração de biomassa e resistência a fatores bióticos e abióticos

Fernanda Keiko Martins Yamauchi Oriolo

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio. Área de Concentração: Agrossistemas

São Paulo

2016

INSTITUTO BIOLÓGICO
PÓS-GRADUAÇÃO

Fernanda Keiko Martins Yamauchi Oriolo

Genotipagem molecular de acessos da Coleção Mundial de Cana-de-açúcar e Gramíneas Correlatas, com aplicações na obtenção de variedades com elevada concentração de biomassa e resistência a fatores bióticos e abióticos

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Área de Concentração: Agrossistemas

Orientadora:

Prof^a Dr^a. Luciana Ap. Carlini-Garcia

São Paulo

2016

Eu, **Fernanda Keiko Martins Yamauchi Oriolo**, autorizo o Instituto Biológico (IB-APTA), da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, a disponibilizar gratuitamente e sem ressarcimento dos direitos autorais, o presente trabalho acadêmico, de minha autoria, no portal, biblioteca digital, catálogo eletrônico ou qualquer outra plataforma eletrônica do IB para fins de leitura, estudo, pesquisa e/ou impressão pela Internet desde que citada a fonte.

Assinatura: _____ Data ____/____/____

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo
Núcleo de Informação e Documentação – IB

Oriolo, Fernanda Keiko Martins Yamauchi.

Genotipagem molecular de acessos da Coleção Mundial de Cana-de-açúcar e Gramíneas Correlatas, com aplicações na obtenção de variedades com elevada concentração de biomassa e resistência a fatores bióticos e abióticos. / Fernanda Keiko Martins Yamauchi Oriolo. - São Paulo, 2016.
48 p.

Dissertação (Mestrado). Instituto Biológico (São Paulo). Programa de Pós-Graduação.

Área de concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema.
Linha de pesquisa: Biodiversidade: caracterização, interações, interações ecológicas em agroecossistemas.

Orientador: Luciana Aparecida Carlini-Garcia.

Versão do título para o Inglês: Molecular genotyping of accessions of the World Collection of Sugarcane and Related Grasses, applied to the obtaining of high biomass varieties with resistance/ tolerance to biotic and abiotic factors.

1. Saccharum spp. 2. Microssatélites 3. Biomassa 4. Perfil molecular I. Oriolo, Fernanda Keiko Martins Yamauchi II. Carlini-Garcia, Luciana Aparecida III. Instituto Biológico (São Paulo). IV. Título

IB/IBI/2016/013

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Fernanda Keiko Martins Yamauchi Oriolo

Título: **Genotipagem molecular de acessos da Coleção Mundial de Cana-de-açúcar e Gramíneas Correlatas, com aplicações na obtenção de variedades com elevada concentração de biomassa e resistência a fatores bióticos e abióticos.** Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio do Instituto Biológico, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Aprovado em: ___/___/___

Banca Examinadora

Profa. Dra. Luciana Aparecida Carlini Garcia

Instituição: PRDTA Centro Sul
APTA/SAA-SP

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. João Ricardo Bachega Feijó Rosa

Instituição: Depto. de Genética
ESALQ/USP

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. Ricardo Harakava

Instituição: Instituto Biológico
APTA/SAA-SP

Julgamento: _____

Assinatura: _____

DEDICO

Ao meu amigo,
companheiro, confidente ..., meu amado
esposo Fernando!

AGRADECIMENTOS

Toda minha gratidão ao Deus Eterno e Todo Poderoso que me concedeu a oportunidade da existência neste mundo, neste tempo, neste momento junto a seres humanos maravilhosos.

A minha fortaleza, a minha tão amada família: avó Maria da Conceição, meus pais Rosemary e Fernando, tios Ulisses Antônio e Paulo Sérgio, irmãs Rosana de Cássia e Estefany e principalmente ao meu amado esposo Fernando que não permitiu que eu desistisse dessa árdua caminhada.

Aos meus familiares por tornarem todos os nossos momentos em inesquecíveis, especiais!

Aos meus antepassados que do modo que lhes foi permitido, contribuíram para que eu chegasse até aqui.

A minha estimada orientadora, professora doutora Luciana Aparecida Carlini-Garcia, por todo o seu conhecimento e contribuição para com a pesquisa e compartilhamento do seu saber comigo.

A querida professora doutora Luciana Rossini Pinto e sua equipe do laboratório de Melhoramento Vegetal - Biologia Molecular do IAC Centro Cana, que me instruíram e colaboraram de modo significativo para a obtenção dos resultados para estudo, além de todo companheirismo, disposição, sabedoria e paciência.

Ao Instituto Biológico, por acreditar na pesquisa e me possibilitar este momento de crescimento profissional, intelectual e pessoal.

Ao Instituto Agrônomo Centro Cana que me acolheram com empenho e dedicação, zelando para a continuidade da pesquisa.

A todos os mestres que passaram pela minha vida de estudante.

Aos colegas de pós-graduação, pelos bate-papos na hora do almocinho.

E a você que está lendo este trabalho que o torna de grande valia.

Com todo meu carinho, meu muito obrigada!

EPIGRAFE

“É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória, nem derrota. ”

Theodore Roosevelt

RESUMO

ORIOLO, F. K. M. Y. **Genotipagem molecular de acessos da Coleção Mundial de Cana-de-açúcar e Gramíneas Correlatas, com aplicações na obtenção de variedades com elevada concentração de biomassa e resistência a fatores bióticos e abióticos.** São Paulo, SP. 2016. Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio).

O Brasil é o principal produtor mundial de cana-de-açúcar, da qual são extraídos açúcar e etanol. As variedades modernas de cana são híbridos interespecíficos, com genoma predominante de *Saccharum officinarum*. Com a necessidade de substituir combustíveis fósseis por biocombustíveis, surgiu a demanda pela obtenção de variedades de cana com perfil bioenergético, visando produção de etanol celulósico, com cogeração de energia. Esta pesquisa objetivou caracterizar geneticamente, por meio de 230 marcadores moleculares (microssatélites), 94 acessos do Banco de Germoplasma de Cana do Centro de Cana do Instituto Agrônomo de Campinas, a maioria deles provenientes da Coleção Mundial de Cana-de-açúcar e Gramíneas Correlatas. Os acessos avaliados são representantes de espécies do Complexo *Saccharum*, com destaque para a *S. spontaneum*, que apresenta elevado teor de fibras e alelos de resistência/tolerância a várias doenças e pragas e a estresse hídrico, características importantes para cana com perfil bioenergético. A partir da genotipagem, foram obtidos os perfis moleculares de cada acesso. Observou-se que a variabilidade genética do material estudado é relativamente elevada, sendo a estimativa da dissimilaridade genética média entre acessos 0,67. A estimativa do Conteúdo de Informação de Polimorfismo na média entre os locos foi de 0,886, enquanto a estimativa do Poder Discriminatório médio dos mesmos foi 0,986. Com apenas dois locos foi possível diferenciar os 94 genótipos. Na análise de agrupamento, foram formados dez grupos de genótipos, embora a divisão entre eles não seja tão clara, o que foi confirmado pelos resultados da análise de coordenadas principais. Esse fato indica de que os genótipos considerados nessa pesquisa parecem se configurar em um painel de cana energia. Pesquisas adicionais serão realizadas para avaliar o desempenho fenotípico desses acessos quanto a características relacionadas à biomassa e à resistência/tolerância a estresses bióticos e abióticos que, juntamente com os dados obtidos na presente pesquisa, permitirão, por exemplo,

estudos de mapeamento associativo e facilitarão a seleção de genitores para realização de cruzamentos, visando obter de variedades de cana com perfil bioenergético.

PALAVRAS-CHAVE: *Saccharum* spp.. Microsatélites. Biomassa. Perfil molecular.

ABSTRACT

ORIOLO, F. K. M. Y. **Molecular genotyping of accessions of the World Collection of Sugarcane and Related Grasses, applied to the obtaining of high biomass varieties with resistance/tolerance to biotic and abiotic factors.** São Paulo, SP. 2016. Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio).

Brazil is the world's first producer of sugarcane, from which sugar and ethanol are extracted. The modern sugarcane varieties are interspecific hybrids, and most of their genome came from *Saccharum officinarum*. As it is necessary to replace fossil fuels by biofuels, there is a demand for sugarcane varieties with bioenergetic profile, aiming to produce cellulosic ethanol with electrical energy cogeneration. This research aimed to genotype, by using 230 molecular markers (microsatellites), 94 accessions of the Sugarcane Germplasm Bank of the Centro de Cana of the Instituto Agronômico de Campinas, most of them from the World Collection of Sugarcane and Related Grasses. The evaluated accessions are representants of *Saccharum* Complex species, and most of them are *S. spontaneum*, species that presents alleles for high fiber content, and resistance/tolerance to several diseases, pests, and hydric stress, important characteristics for cane with bioenergetic profile. Genotyping data provided the molecular profile of each accession. The genetic variability observed among these genotypes is relatively high, once the estimate of the genetic dissimilarity average among them was 0,67. The Polymorphism Information Content estimate among loci was in average 0.886, while the Discriminatory Power average among them was 0,986. Only two loci were enough to differentiate the 94 genotypes. Ten groups of genotypes were obtained according to the cluster analysis, but the clusters are not very well defined, what was confirmed by the results produced from principal coordinate analysis. This fact indicates that the genotypes considered in this research seem to compose an energy cane panel. Additional research will be conducted to evaluate the phenotypic performance of these accessions, for traits related to biomass production, as well as for resistance/tolerance to biotic and abiotic stresses. These phenotypic data jointly considered with the data obtained in the present survey will allow the association mapping analysis, and will facilitate the parents selection to produce new crosses, aiming the obtaining of new cane varieties with bioenergetic profile.

KEYWORDS: *Saccharum* spp.. Microsatellites. Biomass. Fingerprint.

SUMÁRIO

| | |
|--|------|
| RESUMO | VIII |
| ABSTRACT | X |
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 2. OBJETIVOS | 3 |
| 2.1. OBJETIVOS GERAIS | 3 |
| 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 3 |
| 3. REVISÃO DE LITERATURA | 4 |
| 3.1. IMPORTÂNCIA DA CANAVICULTURA | 4 |
| 3.2. CANA-DE-AÇÚCAR | 5 |
| 3.3. USO DE MARCADORES MOLECULARES EM ESTUDOS DE DIVERSIDADE, COM ENFOQUE EM CANA-DE-AÇÚCAR | 9 |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS | 23 |
| 4.1. MATERIAL | 23 |
| 4.2. MÉTODOS | 25 |
| 4.2.1. Coleta de material | 25 |
| 4.2.2. Extração do DNA genômico | 25 |
| 4.2.3. Quantificação do DNA genômico | 25 |
| 4.2.4. Amplificação dos locos de microsatélites (SSRs) via PCR (<i>Polimerase Chain Reaction</i>) | 26 |
| 4.2.5. Genotipagem e estabelecimento dos perfis moleculares usando o Analisador de DNA 4300 da LiCor® | 26 |
| 4.2.6. Análise de perfis moleculares | 27 |
| 4.2.7. Análise de similaridade genética entre os acessos estudados | 27 |
| 4.2.8. Avaliação de acurácia das estimativas em função do número de locos utilizados . | 28 |
| 4.2.9. Análise da estrutura da variabilidade genética entre os acessos | 28 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 29 |
| 5.1. RESULTADOS DAS GENOTIPAGENS | 29 |
| 5.2. ANÁLISE DE SIMILARIDADE GENÉTICA | 31 |
| 5.3. ESTUDO DA ESTRUTURA DA VARIABILIDADE GENÉTICA | 33 |
| 6. CONCLUSÕES | 38 |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 39 |

1. INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar cultivada atualmente (*Saccharum* spp.) é um híbrido interespecífico artificial, obtido pelo cruzamento entre as espécies *S. officinarum* e *S. spontaneum*, podendo ter contribuições também em seu genoma de espécies como *S. sinense*, *S. barberi*, entre outras. Originária da região do Sudeste Asiático e Nova Guiné, a cultura foi propagada pelo globo terrestre por meio de movimentos migratórios humanos, tendo sido trazida ao Novo Mundo por Cristóvão Colombo.

Atualmente, a cultura ocupa lugar de destaque no cenário do agronegócio brasileiro e internacional. De sua matéria-prima, são produzidos açúcar, etanol, energia elétrica resultante da queima do bagaço, cachaça, melação, rapadura, além de ser utilizada *in natura* para alimentação animal. O etanol produzido a partir da cana tem grande importância, vindo a atender, embora parcialmente, à necessidade mundial de substituição dos combustíveis fósseis por biocombustíveis.

O Brasil se destaca no panorama econômico mundial como o maior produtor de cana-de-açúcar, de açúcar e de etanol para o consumo interno e para exportação, sendo que cerca de 55% da produção canavieira concentra-se no Estado de São Paulo.

Tradicionalmente, os programas de melhoramento genético da cana-de-açúcar, no Brasil e no mundo, visam a obtenção de genótipos altamente produtivos, com elevado teor de sacarose e baixo teor de fibra, com bom perfilhamento, resistentes às principais pragas e doenças, entre outros, características típicas de *S. officinarum*, espécie cujo genoma predomina nas cultivares e nas variedades comerciais. Tais objetivos têm sido satisfatoriamente atingidos, tanto que é possível verificar a elevação na produção e na produtividade da cultura ao longo das décadas.

No entanto, nos últimos anos, a demanda por cultivares com elevado teor de biomassa também tem crescido. Plantas com perfil energético permitem o aumento na produção de etanol celulósico (de segunda geração), com cogeração de energia elétrica, favorecendo a substituição de combustíveis fósseis por biocombustível derivado de fonte renovável de energia, que é menos poluente e impacta menos o meio ambiente. Para obter cultivares que continuem sendo produtivas, mas que apresentem teores mais elevados de fibras, biomassa e sejam resistentes a estresses bióticos e abióticos, é necessário buscar, em espécies selvagens do gênero *Saccharum* e/ou de gêneros correlatos, alelos favoráveis a essas características.

O programa de melhoramento genético de cana (Programa Cana) do Centro de Cana do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC/APTA/SAASP) vem trabalhando na

obtenção de ambos os perfis de variedades de cana. Desde 2013, o Brasil, por meio do Centro de Cana Do IAC, localizado em Ribeirão Preto/SP, tem recebido e organizado a terceira réplica da Coleção Mundial de Cana-de-açúcar e Gramíneas Correlatas (CMCAGC), sendo que as outras duas encontram-se em Coimbatore, na Índia, e em Canal Point, nos EUA. Até o momento, foram trazidos de Miami cerca de 400 acessos do Complexo *Saccharum*, os quais foram adicionados ao Banco de Germoplasma de Cana da Instituição, que é composto também por variedades comerciais, clones, introduções provenientes de Meringa/Austrália da coleção do *Bureau of Sugar Experiment Stations* (BSES), entre outros. Respeitado o período de quarentena, iniciou-se o processo de caracterização de todos os genótipos que vêm sendo recebidos pela instituição, visando facilitar o acesso, a manutenção, a preservação e a utilização eficiente desses recursos genéticos no melhoramento da cana.

É nesse contexto que se insere a presente pesquisa, na qual foram caracterizados 94 acessos do Complexo *Saccharum* pertencentes à CMCAGC, por meio de marcadores moleculares do tipo microssatélites (SSRs – *Simple Sequence Repeats*), permitindo estudar a diversidade e a estrutura genética desses acessos. As informações geradas por essas análises serão armazenadas no banco de dados do Centro de Cana e estarão disponíveis aos melhoristas, podendo ser prontamente utilizadas tanto no estabelecimento de estratégias para conservação do germoplasma, quanto nos programas de melhoramento, por exemplo, no direcionamento de cruzamentos visando obtenção de novos genótipos, de acordo com as necessidades do setor canavieiro, no desenvolvimento de mapas genéticos, no mapeamento de QTLs, na seleção genômica, entre outros.

Deve-se destacar que a maioria dos acessos avaliados neste trabalho pertence à espécie *S. spontaneum*, que apresenta características como elevada quantidade de fibras e alelos de resistência a doenças, pragas, estresse hídrico, entre outros, podendo ser utilizadas especialmente no desenvolvimento de novas variedades com perfil energético.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVOS GERAIS

Esta pesquisa teve como *objetivos gerais*:

i) realizar, por meio de marcadores microssatélites, a caracterização molecular de 94 acessos do Complexo *Saccharum*, oriundos da terceira cópia da CMCAGC, mantida no Centro de Cana do IAC/APTA/SAASP;

ii) com base na caracterização molecular, estimar a diversidade genética contida nesse conjunto de acessos, bem como o modo como a mesma se distribui entre os acessos avaliados, de forma a obter, ainda que parcialmente, uma estimativa da estrutura genética da referida coleção;

iii) fornecer os perfis moleculares desses acessos para o banco de dados de perfil molecular do Programa Cana - IAC.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os *objetivos específicos* deste estudo foram:

i) utilizar as informações obtidas sobre a diversidade e a estrutura genética desses acessos no direcionamento de futuras hibridações, buscando combinações promissoras entre diferentes genótipos, visando obtenção de novas cultivares que atendam às demandas do mercado sucroalcooleiro, especialmente no que se refere a cultivares com perfil energético;

ii) disponibilizar informações moleculares que, em associação a dados fenotípicos a serem obtidos em fases posteriores, poderão ser utilizadas para realização de mapeamento associativo desse material para caracteres de interesse, bem como estudar a arquitetura genética dessas características e implementar a seleção assistida por marcadores, aumentando, desse modo, a eficiência no processo de melhoramento genético;

iii) Os perfis moleculares gerados serão armazenados no banco de dados do Centro de Cana, de maneira que essas informações que estejam prontamente disponíveis para fins de conservação de variabilidade genética e uso da mesma nos programas de melhoramento da cana. Além disso, com base nos perfis moleculares, é possível identificar facilmente os genótipos nas diversas fases do programa de melhoramento, evitando que sejam trocados ou erroneamente classificados no decorrer do processo de avaliação.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. IMPORTÂNCIA DA CANAVICULTURA

A canavicultura é de extrema importância para o Brasil e para o mundo, gerando matéria-prima principalmente para a produção de açúcar e etanol. Essa cultura vem ganhando cada vez mais destaque no panorama econômico mundial, diante da necessidade emergente de substituição de combustíveis fósseis por biocombustíveis, sendo estes menos poluentes e obtidos a partir de fontes renováveis de energia, características que favorecem o meio ambiente (LEITE & LEAL, 2007).

No processo de produção de etanol, o bagaço gerado pode ser queimado, produzindo energia elétrica, que tem sido empregada para o funcionamento das próprias usinas, e cujo excedente pode ser vendido e utilizado pelo país, trazendo como vantagem a redução de problemas ambientais e socioeconômicos (GOES, 2008; GERBENS-LEENES et al., 2009; MORETTI, 2010). Conforme mencionado por ÚNICA (2016), o Sistema Único de Saúde (SUS) estima que, até 2030, o consumo de etanol combustível se aproximará de 50 bilhões de litros, levando à diminuição do uso de combustíveis fósseis, com consequente redução de problemas de saúde, o que geraria economia de cerca de 23 bilhões de dólares, que podem ser aplicados ao setor de saúde pública.

O uso de energia elétrica proveniente do bagaço da cana e o emprego do etanol celulósico em substituição aos combustíveis fósseis são benéficos ao meio ambiente, como salientado por Marconato & Santini (2008), contribuindo, portanto, para alterar favoravelmente a matriz energética do país.

Hoang et al. (2015) enfatizam o potencial da cultura da cana no que se refere à produção de biocombustíveis. Mencionam a necessidade de se obterem variedades de cana melhoradas, cuja biomassa seja mais facilmente degradada, maximizando a conversão da mesma em biocombustíveis. Os autores salientam que, para tanto, é necessário entender a genética dos caracteres relacionados à produção de biocombustível na cana, que é um organismo bastante complexo. Os autores ressaltam que a grande variação fenotípica existente no germoplasma de *Saccharum* e a disponibilidade de ferramentas genômicas possibilitam a avaliação dos caracteres associados à produção de biocombustíveis, o estudo da base genética relacionada à composição da biomassa e o estabelecimento dos objetivos do melhoramento da cana visando a produção de biocombustíveis.

O Brasil se destaca por ser o maior produtor mundial de cana, de açúcar e de etanol, sendo que do estado de São Paulo provém cerca de 55% da produção canavieira nacional, destinada tanto ao consumo interno quanto à exportação (BRASIL, 2016).

O aumento de produtividade da cana no Brasil, no decorrer das décadas, é visível. Esse fato pode ser atribuído ao aprimoramento das técnicas de cultivo e tratos culturais, mas destaque especial deve ser dado ao melhoramento genético da cana-de-açúcar que, no decorrer do tempo, muito tem contribuído para elevar a produtividade da cultura, por meio da obtenção de cultivares altamente produtivas, com bom perfilhamento e capacidade de rebrota, resistentes à pragas e à doenças, a estresses abióticos, e que sejam adaptadas às diferentes regiões produtoras do país.

3.2. CANA-DE-AÇÚCAR

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) pertence ao gênero *Saccharum*, tribo Andropogonae, família Poaceae, ordem Cyperales, classe Liliopsida, divisão Magnoliophyta, reino Plantae (CRONQUIST, 1981). Geralmente, são reconhecidas seis espécies como integrantes do gênero *Saccharum*, sendo duas selvagens (*S. spontaneum* e *S. robustum*), e quatro cultivadas (*S. officinarum*, *S. barberi*, *S. sinense* e *S. edule*) (HENRY, 2010; AITKEN & MCNEIL, 2010). No entanto, Cheavegatti-Gianotto et al. (2011) mencionam que há cerca de 35 a 40 espécies dentro desse gênero, refletindo a necessidade de revisão taxonômica do mesmo.

Cultivada em várias regiões do mundo, visando produção de açúcar, foi introduzida no ocidente há mais ou menos 2000 anos, na época de Alexandre, o Grande (Grivet et al., 2004). Nas Américas, a introdução da cana-de-açúcar ocorreu há mais de quinhentos anos, tendo sido atribuída à Cristóvão Colombo (LANDELL & SILVA, 2004; HENRY, 2010). Tratava-se da variedade Crioula (LANDELL & SILVA, 2004), a qual, de acordo com Bremer (1932), resultou da hibridação natural interespecífica entre *S. barberi* e *S. officinarum*. Transcorridos cerca de dois séculos e meio de cultivo após a introdução da cana nas Américas, a variedade Crioula foi substituída por variedades selecionadas a partir de *S. officinarum*, por apresentarem maior teor de sacarose (LANDEL & SILVA, 2004). No entanto, *S. officinarum* é suscetível a muitas doenças e, por esse motivo, cruzamentos interespecíficos entre *S. officinarum* e outras espécies do gênero começaram a ser realizados ao final do século XIX, dando início ao melhoramento genético da cultura (D'HONT, 1996; LANDELL & SILVA, 2004).

Segundo Grivet et al. (2004), os recursos genéticos relacionados à cultura podem ser divididos em três grupos: i) as cultivares tradicionais, que embora sejam pouco cultivadas atualmente, são utilizadas como genitores das canas modernas; são clones originários do processo de domesticação e incluem as cultivares nobres (*S. officinarum*), as cultivares do Norte da Índia e da China (*S. barberi* e *S. sinense*) e a espécie *S. edule*; ii) parentes selvagens relacionados às cultivares tradicionais, provavelmente utilizados como genitores das cultivares tradicionais. Esse grupo de espécies selvagens, que inclui *S. spontaneum*, *S. robustum* e espécies dos demais gêneros do Complexo *Saccharum*, pode ser utilizado como fonte de alelos de interesse em programas de melhoramento genético; iii) cultivares modernas, que substituíram as tradicionais durante o século vinte, tendo sido, em geral, obtidas a partir de vários ciclos de seleção clonal de híbridos interespecíficos entre *S. officinarum* e *S. spontaneum*.

Mukherjee (1957) reuniu os gêneros *Saccharum*, *Erianthus* sect. *Ripidium*, *Narenga* e *Sclerostachya* num conjunto, que denominou de Complexo *Saccharum*, ao qual, foi adicionado, por Daniels & Daniels (1975), o gênero *Miscanthus* sect. *Diandra*. O Complexo *Saccharum*, considerado como a base das canas modernas, foi estabelecido em função da ocorrência de híbridos resultantes de cruzamentos ocorridos entre representantes dos gêneros contidos no grupo. Roach & Daniels (1987) mencionam que a evolução da cana-de-açúcar provavelmente resulta de combinações intergenéricas dentro do complexo. Contudo, estudos baseados em citogenética molecular mostram que variedades modernas de cana apresentam em seu genoma cromossomos provenientes de *S. officinarum* e *S. spontaneum* somente (D'HONT et al., 1996; 1998; 2005; PIPERIDIS & D'HONT, 2001; PIPERIDIS et al.; 2010). Essas divergências podem ser explicadas em função dos diferentes níveis de variabilidade estudados. Como relatado em Aitken & McNeil (2010), o Complexo *Saccharum* foi estabelecido a partir de dados morfológicos de citogenética e de dispersão geográfica e tem sido aceito especialmente pelos melhoristas de cana, mostrando-se útil, por exemplo, na classificação dos acessos de germoplasma da CMCAGC. Porém, mencionam que resultados de estudos baseados em dados moleculares, como os de Irvine (1999) e D'Hont et al. (2002), sugerem que o gênero *Saccharum* seja composto somente por *S. spontaneum* e *S. officinarum*, sendo as demais espécies tipológicas híbridos interespecíficos entre *S. spontaneum* e *S. officinarum*. Como mencionado em revisão realizada por Grivet et al. (2004), é muito provável que a cana-de-açúcar tenha evoluído de uma linhagem específica do gênero *Saccharum*, de modo independente das linhagens que levaram ao gêneros *Erianthus* e *Miscanthus*.

S. officinarum é a principal espécie que contribui com o genoma das cultivares comerciais de cana-de-açúcar. De modo geral, as plantas apresentam elevada concentração de

açúcar e baixo teor de fibra (ALWALA & KIMBENG, 2010), mas são suscetíveis a doenças importantes da cana (LANDELL & SILVA, 2004). De acordo com Roach & Daniels (1987), o centro de diversidade dessa espécie é na Nova Guiné, enquanto o centro de origem é incerto. Daniels & Roach (1987) propuseram seis centros de origem para *S. officinarum*, sendo que o mais provável inclui as regiões do sudoeste da Ásia e da Nova Guiné (ROACH & DANIELS, 1987).

A segunda espécie que apresenta maior contribuição no genoma das canas cultivadas atualmente é *S. spontaneum*. Trata-se de uma espécie selvagem, altamente polimórfica, cujas plantas apresentam colmos ricos em fibras e baixo teor de sacarose, sendo rústicas e tolerantes a estresses abióticos e bióticos, além de serem vigorosas e terem boa capacidade de perfilhamento e rebrota (ROACH & DANIELS, 1987; AUSTRALIA GOVERNMENT, 2004; SCARPARI & BEAUCLAIR, 2008). Segundo Roach & Daniels (1987), muito provavelmente, a Índia é o centro de origem, bem como o centro de domesticação dessa espécie.

Alwala & Kimbend (2010) mencionam que a cana-de-açúcar cultivada atualmente (*Saccharum* spp.) é um organismo complexo, aneupoliploide, altamente heterozigótico, que derivou da hibridação artificial interespecífica entre *S. officinarum* e *S. spontaneum*. Os híbridos resultantes foram seguidas vezes retrocruzados com o ancestral cultivado, para recuperar características de interesse de *S. officinarum*, processo este que foi denominado por Bremer (1961) de nobilitação da cana. De acordo com D'Hont et al. (1996), cerca de 80% do genoma das variedades modernas de cana provêm de *S. officinarum*, 10% de *S. spontaneum* e 10% da recombinação entre eles. Segundo Matsuoka et al. (1999), espécies como *S. sinense*, *S. robustum* e *S. barberi* também contribuíram, mas de modo menos expressivo, na formação das variedades comerciais brasileiras, sendo as cultivares disponíveis de cana-de-açúcar híbridos que se encontram entre a sexta e a décima gerações.

Segundo Arceneaux (1967), a base genética da cultura é estreita em virtude de as variedades modernas de cana se originarem de poucos híbridos resultantes do cruzamento de clones de *S. spontaneum* e *S. officinarum*. Contudo, apresenta nível de divergência genética relativamente alto, o que, provavelmente, deve-se ao elevado nível de poliploidia da cultura (AITKEN & MCNEIL, 2010). Em estudo recente sobre genoma de cana, Garcia et al. (2013) verificaram que a ploidia das cultivares modernas pode variar de 6 a 14, sugerindo um cenário mais complexo do que aquele que se conhece para a cana-de-açúcar, influenciando diretamente o nível de diversidade genética.

Para contornar o problema da base genética estreita da cana, a introgressão, em cultivares modernas, de alelos de interesse provenientes de outras espécies presentes no complexo *Saccharum* é importante, pois, como salientado por Aitken & McNeil (2010), esse procedimento leva à ampliação da variabilidade genética da cultura. Além disso, a ampliação da variabilidade genética conduz à redução da vulnerabilidade dos canaviais a situações desfavoráveis, como a presença de um novo patógeno, ou de algum estresse abiótico ao qual a cultura poderia ser suscetível.

Os programas de melhoramento de cana-de-açúcar sempre tiveram como objetivo principal obter variedades altamente produtivas, com alta concentração de sacarose, bom perfilhamento e capacidade de rebrota, resistência/tolerância às principais doenças, pragas, e demais estresses bióticos e abióticos, características importantes para a produção de açúcar e álcool. Resulta desse fato, a grande contribuição de *S. officinarum* na constituição do genoma das variedades de cana comerciais, como destacado por Bremer (1961), Scarpari & Beauclair (2008) e evidenciados nos estudos de D'Hont et al. (1996; 1998), entre outros.

Porém, nos últimos anos, os programas de melhoramento genético de cana também têm direcionado esforços na obtenção de genótipos que apresentem elevada concentração de biomassa (LANDELL & BRESSIANI, 2008), visando produção de etanol celulósico com cogeração de energia elétrica.

Nesse contexto, o Programa Cana do Centro de Cana do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC/APTA/SAA-SP) tem investido na organização de uma Coleção Pública de Germoplasma representativa do Complexo *Saccharum*. Atualmente, em seu acervo, o Centro possui variedades comerciais, clones promissores e acessos de várias espécies do gênero *Saccharum* e de gêneros relacionados. Nos últimos anos, centenas de acessos selvagens dos gêneros *Saccharum*, *Miscanthus*, *Erianthus*, entre outros, foram incorporados nessa coleção, uma vez que, em 2013, o Centro de Cana foi escolhido pela comunidade internacional como a terceira instituição mantenedora da CMCAGC, sendo que as outras duas cópias encontram-se em Coimbatore (Índia), e em Canal Point (Estados Unidos). A partir de então, mais de 400 acessos desta coleção foram trazidos para o Centro de Cana. Dezesete acessos de cana também foram importados do BSES (Bureau of Sugar Experiment Stations), de Queensland, Austrália.

Finalizado o período de quarentena dos acessos importados, que foram incorporados ao Banco de Germoplasma do Centro de Cana, foi iniciado o processo de caracterização dos mesmos. Essa caracterização é muito importante, pois além do objetivo de manter a variabilidade genética de cana nesse banco de germoplasma, os acessos de espécies selvagens podem ser utilizados pelos programas de melhoramento, visando transferir características

importantes para as cultivares modernas de cana, de modo a atender às demandas do setor sucroalcooleiro. Assim como no caso das demais culturas, como mencionado por Que et al. (2014), conhecer o germoplasma de cana é a base para conservação e uso no melhoramento.

Com base nesses conhecimentos, um dos usos mais importantes desse germoplasma estaria voltado à demanda pela produção de etanol celulósico, pela transferência de alelos de *S. spontaneum* para as cultivares modernas de cana, com o objetivo de elevar a concentração de fibras, de biomassa e de conferir resistência/tolerância a estresses bióticos e abióticos a esses genótipos cultivados, produzindo variedades com perfil energético.

Ressalta-se ainda que a caracterização do banco de germoplasma também permite o estabelecimento de coleções nucleares, as quais facilitam a conservação e o uso dos recursos genéticos pelos programas de melhoramento. Tai & Miller (2001), por exemplo, avaliaram 342 acessos de *Saccharum spontaneum* presentes na CMCAGC. Utilizaram diferentes formas de amostragem, avaliaram de caracteres quantitativos e consideraram informações sobre origem geográfica dos genótipos, o que lhes permitiu, ao final do estudo, estabelecer uma coleção nuclear da espécie, composta por 75 acessos. Todd et al. (2014) também avaliaram caracteres morfológicos visando estabelecer uma coleção nuclear de espécies do gênero *Saccharum* e de gêneros relacionados, a partir da CMCAGR, situada em Miami. Foram selecionados 300 acessos para compor a coleção nuclear, a qual apresenta, para os caracteres avaliados, índice de diversidade similar ao da referida coleção, sendo representativa da mesma.

3.3. USO DE MARCADORES MOLECULARES EM ESTUDOS DE DIVERSIDADE, COM ENFOQUE EM CANA-DE-AÇÚCAR

O emprego de marcadores moleculares é de grande importância nas diversas áreas de estudo relacionadas à genética e ao melhoramento, permitindo grandes avanços em pesquisas dessa natureza. Estudos de diversidade genética das mais diferentes espécies, com auxílio de marcadores moleculares, têm sido realizados com muito sucesso há décadas e os resultados vêm auxiliando os pesquisadores a determinarem estratégias de conservação e uso de recursos genéticos, a estabelecerem grupos heteróticos, a escolherem genitores para realização de hibridações, entre outros.

Pesquisas sobre diversidade genética, via marcadores moleculares aplicados à cana-de-açúcar, vêm sendo realizadas há vários anos, gerando resultados importantes no que diz respeito à história evolutiva das espécies relacionadas à cana moderna e informações valiosas para estabelecimento de estratégias de conservação e uso de germoplasma da cultura. Em revisão, D'Hont & Glaszmann (2001) avaliaram que os marcadores moleculares são de

grande utilidade no estudo de cana e espécies correlatas do Complexo *Saccharum*, podendo-se citar, dentre outras, as seguintes aplicações: análise de estrutura genômica das cultivares modernas por meio da técnica de GISH (*Genomic In Situ Hybridization*); mapeamento genético e mapeamento de QTLs (*Quantitative Trait Loci*); avaliação de diversidade entre cultivares e estabelecimento de estratégias para uso do germoplasma; identificação de cultivares; controle de progênes; monitoramento de introgressão de alelos; seleção assistida por marcadores. Agarwal et al. (2008) realizaram revisão detalhada sobre diversos tipos de marcadores moleculares e suas aplicações em estudos de genética, a qual deve ser consultada para obtenção de detalhes sobre tais técnicas e suas aplicações. Sharma et al. (2014) salientam que a caracterização da diversidade genética baseada em marcadores moleculares é muito importante para os melhoristas no desenvolvimento de programas de melhoramento genético. A seguir, serão relatados vários trabalhos na área de genética e melhoramento de cana-de-açúcar, nos quais os autores empregaram marcadores moleculares para estudar a diversidade genética, as relações evolutivas, para obter perfis moleculares, etc., de *taxa* representantes do complexo *Saccharum*.

Lu et al. (1994a) concluíram que os marcadores do tipo RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) eram adequados para estudos da constituição genômica das variedades modernas de cana, cuja origem é interespecífica. Avaliaram 50 acessos de cana, incluindo genótipos selvagens e cultivares antigas, e usaram 1110 locos RFLPs para calcular a similaridade genética entre acessos. A partir de análises multivariadas, observaram que as espécies *S. spontaneum*, *S. robustum* e *S. officinarum* formaram três grupos distintos, em concordância com classificação taxonômica clássica e relacionaram a estrutura observada entre clones de *S. spontaneum* com a origem geográfica dos mesmos. Os resultados também corroboram a teoria da origem secundária de *S. barberi* e *S. officinarum*.

Ao aplicarem esse mesmo tipo de marcador para avaliar a diversidade genética de 40 variedades cultivadas de cana-de-açúcar, Lu et al. (1994b) observaram que tais variedades cultivadas pareciam ser proximamente relacionadas aos clones de *S. officinarum*, enquanto o principal componente de diversidade varietal parecia ser proveniente de genes de *S. spontaneum*. Isso, provavelmente, deve-se ao fato de o genoma das variedades comerciais ser predominantemente oriundo de *S. officinarum* e ao fato de *S. spontaneum* ser uma espécie que apresenta elevada variabilidade genética, como relatado em outros estudos mencionados na presente revisão. Lu et al. (1994b) obtiveram estimativa da similaridade média no valor de 0,61, verificaram a existência de fraca estrutura global entre os acessos e mencionam que traços de desequilíbrio de ligação observados podem ser atribuídos aos cromossomos de *S.*

spontaneum presentes nas variedades. Ainda, sugeriram o uso de populações constituídas por variedades modernas em estudos de associação entre caracteres agronômicos e marcadores moleculares.

D'Hont et al. (1995) utilizaram isoenzimas, DNA ribossômico, RFLPs e hibridação *in situ* (GISH - *genomic in situ hybridization*) na caracterização de oito híbridos intergenéricos entre *S. officinarum* e *E. arundinaceus*. Encontraram bandas específicas de RFLP para *E. arundinaceus* e, por meio da técnica GISH, puderam identificar a contribuição de cada espécie nos híbridos e concluir que os marcadores moleculares podem auxiliar no emprego do genoma de *Erianthus* no melhoramento genético da cana.

Besse et al. (1997) avaliaram, por meio de 112 marcadores RFLPs, 65 acessos referentes a sete espécies do gênero *Erianthus* e 14 do gênero *Saccharum* (8 de *S. spontaneum* e 6 de *S. officinarum*). A separação de acessos em função da distribuição geográfica foi consistente com o número de cromossomos apresentado por eles, sendo que *E. arundinaceus*, proveniente da Indonésia, divergiu de *E. arundinaceus* e *E. procerus* originários da Índia, enquanto *E. bengalense* ocupou posição intermediária. Os autores ainda observaram maior variabilidade genética dentro de *S. spontaneum* do que dentro de *S. officinarum*, em consonância com outros relatos na literatura.

Besse et al. (1998) utilizaram 276 marcadores AFLPs (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) no estudo da diversidade genética dentro e entre os gêneros *Saccharum*, *Erianthus* sect. *Ripidium*, com espécies originárias do Velho Mundo (Australásia, a leste da linha de Wallace) e *E. giganteum*, espécie nativa da América do Norte. Consideraram 26 acessos de *E. giganteum*, 14 de *E. sect. Ripidium*, 2 de *S. officinarum* e 4 de *S. spontaneum*. A partir das estimativas de similaridade genética, realizaram análise de agrupamento, tendo encontrado três grandes grupos: i) grupo com espécies do gênero *Saccharum*, com dois subgrupos; ii) grupo com indivíduos de cinco espécies de *E. sect. Ripidium*; iii) grupo com todos os acessos de *E. giganteus*, subdividido em três subgrupos, cuja estrutura genética correspondeu aos citótipos dentro da espécie americana.

Jannoo et al. (1999) empregaram 386 marcadores RFLP para estudar 162 clones de cana-de-açúcar, sendo 109 cultivares modernas (híbridos interespecíficos) e 53 acessos de *S. officinarum*. Observaram maior diversidade entre os clones de *S. officinarum* oriundos da Nova Guiné, em consonância com a hipótese de que este local corresponda ao centro de origem da espécie. Os clones da Nova Caledônia formaram um outro grupo, estando representado por acessos que podem ter recebido introgressões oriundas de espécies presentes no complexo *Saccharum*. As cultivares modernas avaliadas foram subdivididas em dois grupos principais,

sendo um com genótipos provenientes de Barbados, que não apresentam alelos de *S. spontaneum*, e outro com acessos de Mauritius, os quais apresentam alelos oriundos de tal espécie.

Chen et al. (2001) utilizaram 145 marcadores RAPDs (*Random Amplified Polymorphic DNA*) polimórficos para estudar a diversidade genética de 195 acessos de *S. spontaneum* provenientes de várias regiões geográficas da China e, adicionalmente, realizaram análise filogenética entre os haplótipos. Verificaram que a topologia da árvore filogenética da espécie corresponde à distribuição geográfica da mesma e a estimativa da variabilidade genética interpopulacional (62,95%) foi superior a da intrapopulacional (37,05%) e, tanto a variação como a diversidade genética das populações, concordam com o conhecimento prévio sobre a distribuição geográfica da espécie na China. Com base nesses resultados e em informações arqueológicas e de coleções de cana, os autores propuseram que a província de Yunnan seja o centro de origem de *S. spontaneum* na China.

Ao utilizarem marcadores RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) para estimar a diversidade genética entre 86 acessos de *S. spontaneum* na China, Fan et al. (2001) observaram que os genótipos da região de Yunnan apresentavam elevada diversidade genética e que o polimorfismo se reduzia com o aumento da latitude e da altitude. Os acessos se distribuíram em oito ecótipos diferentes e a árvore filogenética obtida mostrou-se associada à distribuição geográfica da espécie, parecendo haver indicação de que, em Yunnan, a espécie se originou no sul e, posteriormente, dispersou-se para lugares mais elevados e com maiores latitudes, no noroeste e nordeste da região.

Nair et al. (2002), com uso de 25 marcadores RAPD, estimaram em 0,29 a distância genética média entre 28 importantes variedades indianas de cana, evidenciando a similaridade genômica entre elas. Em função da limitada diversidade genética observada, decorrente do número reduzido de genitores que deram origem ao painel estudado, os quais provavelmente são aparentados entre si, os autores mencionam a necessidade de se introduzirem novas fontes de genes no processo de obtenção de variedades. Verificaram que o uso de informações sobre parentesco e a origem tropical ou subtropical das variedades pouco auxiliaram na determinação dos agrupamentos.

No Brasil, o primeiro trabalho a utilizar marcadores moleculares para avaliar a diversidade genética em cana-de-açúcar foi realizado por Lima et al. (2002). Os autores compararam as estimativas do coeficiente de parentesco, obtidas a partir de dados de genealogia dos acessos avaliados, e estimativas da similaridade genética (Jaccard) de 83 genótipos de cana-de-açúcar (79 cultivares - *Saccharum* spp., 1 acesso de *S. sinense*, 1 de *S. barberi* e 2 de *S.*

officinarum). A partir de 1121 AFLPs polimórficos, verificaram que as estimativas de similaridade genética variaram de 0,28 a 0,89, com média de 0,47, enquanto as do coeficiente de parentesco variaram de 0 a 0,503, com média de 0,057. A correlação entre as estimativas do coeficiente de parentesco e da similaridade genética foi 0,42, altamente significativa. Concluíram que os marcadores AFLPs possibilitaram obter estimativas com maior acurácia do grau de parentesco entre cultivares de cana. O dendrograma produzido a partir das estimativas de similaridade entre os acessos gerou vários subgrupos e indicou importante relação entre as cultivares estudadas.

Parte desses acessos foi posteriormente analisado, por meio de outros tipos marcadores, nos trabalhos de Pinto et al. (2004; 2006), Oliveira et al. (2009) e Marconi et al. (2011), que serão detalhados posteriormente. Além disso, dos 83 acessos estudados por Lima et al. (2002), 73 fazem parte do Painel Brasileiro de Variedades de Cana-de-Açúcar (PBVCA), o qual foi construído de modo a conter as cultivares mais plantadas nas lavouras comerciais do Brasil, principais ancestrais e genitores usados em cruzamentos no país, genitores utilizados em populações de mapeamento genético e cultivares promissoras obtidas por programas nacionais de melhoramento de cana (ROSA, 2011; SILVA, 2013). O painel é composto por 142 acessos de cana (SILVA, 2013; GARCIA et al., 2013).

Cordeiro et al. (2000) utilizaram marcadores microssatélites (SSR – *simple sequence repeats*) para analisar variedades cultivadas de cana e verificaram que tais marcadores são de grande valia para estudos nas áreas de genética e melhoramento da cultura, como análises de germoplasmas, seleção de genitores, correta identificação de cultivares, seleção assistida por marcadores, entre outros. Salientam que os SSRs, além de serem reprodutíveis entre laboratórios, são mais polimórficos que os AFLPs e os RFLPs (*restriction fragment length polymorphism*), sendo também, como mencionado por Agarwal et al. (2008), que há locos microssatélites que apresentam especificidade a determinadas espécies.

Em 2001, Silva destacou que, por serem polimórficos e facilmente transferíveis, os EST-SSRs, localizados em sequências expressas do genoma, as EST (*Expressed Sequence Tag*), seriam muito úteis no estudo de espécies do gênero *Saccharum*. Ressaltou que o elevado número de SSRs provenientes do SUCEST (*Sugarcane Expressed Sequence Tag Project*) teria grande potencial na construção de mapas de ligação e no planejamento de cruzamentos.

Cordeiro et al. (2001) estudaram EST-SSRs de cana e observaram que tais marcadores são transferíveis para outros gêneros do complexo *Saccharum*, como *Erianthus* e *Sorghum*. Verificaram que o nível de polimorfismo não foi alto entre as cultivares de cana, mas foi elevado quando utilizaram um subgrupo de tais marcadores na avaliação dos genitores e

acessos de *Erianthus* e *Sorghum*. Mencionaram que, diferentemente dos EST-SSRs, os SSRs genômicos apresentavam maior polimorfismo quando empregados na análise de cultivares de cana, não sendo, porém, transferíveis para outros gêneros.

Selvi et al. (2003) utilizaram microssatélites produzidos para milho para estudar 30 variedades comerciais de cana. De 34 *primers* de milho testados, 14 foram amplificados em *Saccharum* e *Erianthus*, resultando em 41,2% de transferibilidade, sendo que 9 desses 14 fragmentos foram polimórficos em *Saccharum* e somente 4 em *Erianthus*. Observaram que foi possível diferenciar todas as variedades estudadas, confirmando o potencial desse tipo de marcador na identificação varietal e construção de perfis genotípicos em cana. Verificaram que esses marcadores permitiram diferenciar espécies dos gêneros *Saccharum* e *Erianthus*, bem como as relações entre elas.

Ao estudarem 33 clones de *S. spontaneum* e duas cultivares de cana, com emprego de marcadores RAPD, Pan et al. (2004) verificaram que as cultivares apresentaram estimativa de similaridade genética maior (0,82) que as estimadas entre os pares de clones de *S. spontaneum*, que variaram de 0,605 a 0,752. Foram formados nove grupos na análise de agrupamento, oito dos quais continham os clones de *S. spontaneum*, sendo que a alocação dos clones dentro dos grupos foi independente da morfologia e da origem geográfica dos mesmos. O nono grupo foi formado apenas pelas duas variedades. Relataram que um único *primer* de marcador RAPD foi suficiente para distinguir todos os clones de *S. spontaneum*, com exceção de um par de clones que, para ser distinto, foi necessário o uso de dois pares de *primers*. Além disso, um produto de amplificação do *primer* OPA-11 mostrou-se como cultivar-específico e seu uso foi incorporado no programa de melhoramento de cana da Louisiana (USDA-ARS, *United States Department of Agriculture-Agricultural Research Service - Sugarcane Research Unit at Houma*), a qual pertence a coleção de genótipos avaliados por Pan et al. (2004). Os autores mencionam ainda que as informações geradas podem auxiliar na conservação de variabilidade genética da espécie.

Zhang et al. (2004) também utilizaram marcadores moleculares (RAPDs, *Inter-Single Sequence Repeated* - ISSRs, e *Internal Transcribed Spacer* - ITSs) com a finalidade de acessar a diversidade genética de *Erianthus* e *S. officinarum*, esclarecer a classificação molecular de espécies relacionadas ao gênero *Saccharum* e caracterizar um híbrido intergenérico entre *Saccharum* e *Erianthus*.

Com o intuito de avaliar o nível de polimorfismo apresentado por marcadores EST-SSRs em cana, Pinto et al. (2004) empregaram 30 marcadores desse tipo na análise de 18 dos 83 acessos previamente estudados por Lima et al. (2002), a saber: 13 clones comerciais de

cana, 2 genitores de uma população de mapeamento (SP80-180 e SP80-4966), 1 clone de *S. officinarum* (IJ76-314), 1 de *S. barberi* (Gandacheni) e 1 de *S. sinense* (Maneria). Dos 30 EST-SSRs testados, vinte e três mostraram-se polimórficos, com PIC médio estimado em 0,66. Os autores também avaliaram o potencial desses marcadores na construção de mapas genéticos, tendo como material de estudo os dois genitores supramencionados (SP 80-180; SP 80-4966) e seis indivíduos F₁ aleatoriamente amostrados de sua progênie. Cinquenta e duas marcas exibiram segregação nos genitores e na progênie, tendo, portanto, potencial para uso no mapeamento genético de cana. Adicionalmente, verificaram que os EST-SSRs estavam em grupos com homologia em relação a proteínas associadas à via metabólica da produção de açúcar, podendo ser usados na construção de mapa funcional de cana. É importante mencionar que os 18 acessos estudados por Pinto et al. (2004) foram avaliados em pesquisas mais recentes, com base em outros tipos de marcadores (PINTO et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2009; MARCONI et al., 2011), ampliando o escopo do de tal estudo. Esses trabalhos serão descritos posteriormente nessa revisão.

Cai et al. (2005a) estudaram a relação de *Erianthus rockii* com outras dezesseis espécies distribuídas entre os gêneros *Saccharum*, *Erianthus*, *Miscanthus*, *Narenga* e *Sclerostachya*, todos componentes do complexo *Saccharum*. A espécie *E. rockii* é interessante para programas de melhoramento genético da cana, uma vez que possui alelos de tolerância ao frio e ao estresse hídrico. Nesse estudo, utilizaram 176 AFLPs e 241 SSRs e, a partir dos coeficientes de Jaccard, calculados entre os pares de indivíduos, realizaram análise de componentes principais (*Principal Component Analysis*, PCA), uma para dados oriundos de cada tipo de marcador. Os resultados obtidos a partir de ambas as análises de PCA foram semelhantes e sugerem que *E. rockii* seja distinto das outras espécies de *Erianthus* estudadas, bem como das demais espécies de *Saccharum* consideradas nesse estudo. *E. rockii* agrupou-se com *E. fulvus*, *M. sinensis* e *M. floridulus*, formando um grupo intermediário entre os grupos maiores formados por espécies do gênero *Saccharum* e as demais espécies do gênero *Erianthus* consideradas (*E. arundinaceus*, *E. elephantinus*, *E. procerus*, *E. ravennae*, *E. senegalense* e *E. sarpet*).

Cai et al. (2005b) utilizaram marcadores 5S rRNA para verificar introgressão de alelos de *E. arundinaceus*, que tem características importantes como boa rebrota, tolerância a estresse hídrico, vigor, resistência a doenças, etc., em *Saccharum*. Foi realizado o cruzamento entre *S. officinarum* x *E. arundinaceus* e a progênie F₁ foi obtida. Essa progênie foi retrocruzada com um clone de *Saccharum* spp. resultando em indivíduos BC₁. Os autores aplicaram os marcadores 5S rRNA PCR para avaliar os indivíduos F₁ e BC₁, tendo sido confirmada a

presença de alelo de *E. arundinaceus* nas progênes. Segundo eles, esse foi o primeiro relato em que se avaliou, por meio de marcadores moleculares, a ocorrência de indivíduos BC₁, originários de retrocruzamento entre um híbrido *S. officinarum* x *E. arundinaceus* e *S. spp.* Afirmam que, com uso desse método, é possível explorar alelos de interesse provenientes do germoplasma de *E. arundinaceus* nos programas de melhoramento de cana.

Sheji et al. (2006) caracterizaram, molecularmente, 40 clones de *S. spontaneum* provenientes de quatro regiões geográficas da Índia, com base em 364 bandas polimórficas de RAPD e 48 bandas polimórficas a partir de 2 locos ISSR e dois motivos da região de telômero. A estimativa média da diversidade genética foi de 48,9% e as estimativas da distância genética entre os acessos variaram de 29,8 a 60,0. Verificaram que os acessos provenientes da região Arunachal Pradesh eram mais divergentes entre si, constituindo-se em fontes potenciais de variabilidade genética a serem exploradas por programas de melhoramento genético da cana. Destacam que *S. spontaneum* é a espécie selvagem que apresentam maior diversidade no gênero *Saccharum* e que o germoplasma dessa espécie, presente nas coleções mundiais, representa diversos grupos geográficos.

Aitken et al. (2006) analisaram 421 clones de cana cultivada por meio de marcadores AFLP. Desses clones, 270 eram da espécie *S. officinarum* e 151 são cultivares australianas ou genitores importantes para o programa de melhoramento de tal local. A partir dos 614 locos polimórficos encontrados, obtiveram um dendrograma e verificaram que os clones oriundos da Nova Guiné apresentaram maior diversidade que os clones originários de outras regiões, fato que está em concordância com a hipótese de que esta localidade seja o centro de origem da espécie. Os clones do Hawai e de Fiji formaram um grupo separado, sendo que, provavelmente, apresentam introgressões de alelos provenientes de outros membros do complexo *Saccharum*. Observaram também maior diversidade entre as cultivares em relação aos clones, pois aquelas possuem introgressões de alelos de *S. spontaneum*. Embora poucos clones tenham sido usados como genitores das cultivares, os autores observaram que 90% dos alelos presentes na coleção de clones de *S. officinarum* também se encontram na coleção de cultivares.

Pinto et al. (2006) compararam o polimorfismo detectado por 51 EST-SSRs e 50 gSSRs (microssatélites genômicos) nos mesmos 18 acessos de cana avaliados por Pinto et al. (2004). Verificaram que, embora o polimorfismo acessado pelos gSSRs tenha sido maior, as estimativas do poder de discriminação entre genótipos e das similaridades genéticas não diferiram entre os tipos de marcadores, tendo havido correlação alta e significativa entre as similaridades genéticas estimadas pelos EST-SSRs e gSSRs e os dendrogramas produzidos por

cada tipo de marcador apresentaram boa concordância com as informações genealógicas dos fenótipos em estudo. Os autores concluíram que os EST-SSRs podem ser usados nas análises das relações genéticas em cana, inclusive em nível funcional, já que tais marcadores são oriundos de sequências expressas no genoma.

Pan (2006) utilizou 221 marcadores SSR para caracterizar o germoplasma de cana dos Estados Unidos. Avaliou cinco clones elites, dois provenientes do estado da Louisiana, dois do estado da Flórida e um quinto clone, utilizado como genitor em programas de melhoramento dos dois estados. Encontrou 350 locos polimórficos e as estimativas do PIC variaram entre 0,56 e 0,80. Verificou que vários desses marcadores foram altamente polimórficos, sendo úteis nas avaliações de germoplasma de cana, teste de identidade varietal, análise de paternidade e confirmação de cruzamentos efetuados.

Alwala et al. (2006) utilizaram 529 bandas polimórficas de TRAP (*Target Region Amplification Polymorphism*) relacionados aos caracteres teor de sacarose e tolerância ao frio e realizaram análises de agrupamento e de coordenadas principais (PCoA - *Principal Coordinate Analysis*), para avaliar a diversidade e as inter-relações de 30 acessos provenientes dos gêneros *Saccharum* (*S. officinarum*, *S. barberi*, *S. sinense*, *S. spontaneum*, *S. robustum*, cultivares derivadas de mutações e híbridos intergenéricos entre *S. officinarum* e *S. spontaneum*), *Miscanthus* e *Erianthus*. Observaram que, de acordo com as análises multivariadas, os três gêneros foram distintos, em concordância com a classificação taxonômica. Os acessos de *S. spontaneum*, com tolerância ao frio e baixa sacarose, formaram um grupo distinto dentro do agrupamento do gênero *Saccharum*, enquanto as demais espécies ficaram misturadas dentro do grupo formado pelo gênero.

Suman et al. (2008) avaliaram 30 genótipos de cana, incluindo acessos de *S. officinarum*, *S. spontaneum*, *S. robustum*, *S. sinense*, *S. barberi*, *Miscanthus*, *Erianthus* e híbridos interespecíficos, por meio de marcadores SRAPs (*Sequence Related Amplified Polymorphisms*), os quais amplificam regiões genômicas ricas em genes. Observaram elevado polimorfismo (1135 marcas polimórficas) e relataram a presença de 119 marcadores espécie-específicos. As similaridades genéticas estimadas entre pares de acessos variaram de 0,60 a 0,96, com média de 0,79 e, de acordo com o dendrograma, os genótipos se distribuíram em três grupos, um com os acessos de *Miscanthus* e *Erianthus*, outro com acessos de *S. spontaneum* e o terceiro com os demais acessos. Concluíram que os marcadores SRAP se constituem em ferramenta robusta que pode ser usada tanto na construção de mapas genéticos quanto à seleção assistida por marcadores, visando introgressão de genes em cana.

Oliveira et al. (2009) testaram 342 marcadores EST-SSRs para analisar 18 variedades de cana, previamente estudadas por Pinto et al. (2004; 2006). Foram encontrados 224 marcadores polimórficos, dos quais, 82,1% são funcionais e apresentam elevada homologia com genes conhecidos, tendo muita utilidade em estudos de mapeamento genético, mapeamento de QTLs e de genômica comparativa, por estarem localizados dentro de regiões funcionais do genoma. As estimativas de PIC variaram entre 0,16 e 0,94, com média de 0,73, e as estimativas do poder discriminatório de cada grupo de EST-SSR foi elevada (em média, 0,84), atingindo valor máximo para 14 marcadores EST-SSRs, indicando a utilidade desses marcadores em estudos de parentesco, construção de mapas genéticos, entre outros.

Almeida et al. (2009) utilizaram 37 *primers* de ISSR para caracterizar, molecularmente, 14 cultivares de cana fornecidas pelo Programa de Melhoramento Genético da Cana-de-Açúcar de Alagoas, vinculado à RIDESA (Rede Inter Universitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroenergético). Oito *primers* geraram fragmentos amplificados, resultando em 53 polimorfismos, a partir dos quais foram estimadas as similaridades genéticas entre as cultivares. Tais estimativas variaram de 22% a 77% e os autores verificaram que sete *primers* seriam suficientes para distinguir todas as variedades estudadas e ressaltam a utilidade desse tipo de marcador não só em análises de diversidade genética, mas também na geração de padrões genéticos (*fingerprint*) particulares a cada acesso, permitindo a fácil identificação dos mesmos.

Parida et al. (2009) geraram 1315 marcadores microssatélites (SSRs) denominados SEGMS (*Sugarcane Enriched Genomic Microsatellite*), os quais foram disponibilizados ao domínio público. Ao utilizarem esses marcadores para estudar espécies, gêneros e variedades de cana, estimaram o nível de polimorfismo em 88,6% e taxa de transferibilidade de 93,2% dentro do complexo *Saccharum*. As estimativas de diversidade genética variaram de 0,16 a 0,82, com média de 0,44. De acordo com os autores, o alto nível de polimorfismo e de variabilidade genética são indicativos da utilidade desses marcadores em estudos de genotipagem em cana.

Creste et al. (2010) compararam o uso de diferentes marcadores moleculares na estimação das relações genéticas entre 82 clones e variedades de cana-de-açúcar. Foram utilizados 4 *primers* de TRAP, desenhados a partir de genes candidatos relacionados com resposta metabólica de tolerância à seca, 10 *primers* de SSR e 5 *primers* de AFLP. Foram observados 160 marcadores TRAP, 103 SSR e 145 AFLPs, resultando num total de 410 marcas polimórficas. Para cada tipo de marcador, foi estimada a similaridade genética entre os acessos, por meio do coeficiente de Jaccard, e os valores dessas estimativas foram 0,675, 0,655 e 0,522

para AFLPs, TRAPs e SSRs, respectivamente. Os autores concluíram que a escolha do tipo de marcador varia com a finalidade do estudo. No caso dos SSRs, por exemplo, mesmo com menor número de bandas polimórficas, foi possível detectar maior divergência entre os genótipos estudados.

Jackson et al. (2010) resumiram os resultados obtidos a partir de projeto desenvolvido em colaboração pela China e pela Austrália, com objetivo geral de utilizar germoplasma selvagem de cana China em programas de melhoramento de ambos os países. Um dos focos do trabalho foi avaliar diversidade genética de acessos de *S. spontaneum* e de *Erianthus arundinaceus*. Os autores utilizaram 676 marcadores AFLPs na genotipagem de 443 clones de *S. spontaneum*. Foi feita análise dos componentes principais, com base nos dados dos marcadores, a qual indicou que os clones tendem a se reunir em dois grupos, um com genótipos de origem tropical, predominantemente oriundos do sul da Índia e do sudeste asiático, e outro subtropical, com a maioria dos acessos provenientes do norte da China e da Índia. Além disso, o elevado polimorfismo detectado nesses clones, segundo os autores, dá suporte à ideia de que *S. spontaneum* é a espécie que apresenta maior diversidade dentro do seu gênero.

Jackson et al. (2010) também estudaram 220 clones da espécie *Erianthus arundinaceus* e verificaram que os clones do norte da China apresentam maior diversidade que os clones da Indonésia, havendo uma tendência de os clones da China se separarem em função de seu local de origem (leste e oeste).

Singh et al. (2010) estudaram a variabilidade genética presente em 84 acessos de cana, incluindo cultivares indianas e não indianas e as espécies *S. barberi*, *S. officinarum* e *S. spontaneum*. Utilizaram marcadores moleculares, incluindo cDNAs derivados de SSRs de cana, SSRs genômicos e microssatélites unigênicos de cana. Os SSRs genômicos exibiram menor número médio de alelos por loco e menores valores das estimativas de PIC, ao contrário do que se observou no estudo de Pinto et al. (2006). Dentre os resultados, verificaram que os acessos de *S. spontaneum* apresentaram número maior de bandas que os de *S. barberi*.

Marconi et al. (2011) desenvolveram 365 marcadores EST-SSRs derivados do SUCEST, dos quais 197 foram utilizados na avaliação dos 18 acessos de cana estudados previamente por Lima et al. (2002), Pinto et al. (2004; 2006) e Oliveira et al. (2009). As estimativas do PIC variaram de 0,21 a 0,92 entre os marcadores, com média de 0,69, enquanto a estimativa do poder discriminatório foi, em média, 0,80. Dentre os marcadores identificados no estudo, alguns deles são de maior interesse por estarem associados à defesa contra bactérias, ao processo de metabolismo de carboidratos e à geração de precursores de metabólitos e energia.

Visando obter informações básicas sobre *S. spontaneum*, que vem sendo utilizada em programas de melhoramento genético de cana e inclusive vem sendo testada na obtenção de cultivares com perfil bioenergético, Chang et al. (2012) analisaram 80 plantas provenientes de nove diferentes populações chinesas dessa espécie. O número de plantas coletadas por população variou de 5 a 15 e o objetivo do trabalho foi verificar como a variabilidade genética estava estruturada entre e dentro dessas populações. Para tanto, utilizaram marcadores moleculares do tipo SRAP, obtendo 185 bandas polimórficas. As estimativas dos índices de diversidade de Ney e de Shannon foram, respectivamente, 0,2801 e 0,4155. A estimativa de diversidade interpopulacional foi de 0,2088 e a do fluxo de genes foi de 1,8944. Segundo os autores, houve predomínio de diversidade intrapopulacional.

Shanthi et al. (2013) mencionam que os marcadores SSR são muito valiosos na análise do genoma da cana, aumentando a eficácia dos programas de melhoramento baseados em marcadores moleculares. SSR gênicos são marcadores funcionais e estão associados a regiões codificadoras do genoma, relativamente bem conservadas. Os autores identificaram e utilizaram 21 pares de *primers* da família de fatores de transcrição WRKY (pronuncia-se *worky*) e 10 proteínas de resistência a doenças para avaliar 24 clones de cana. Verificaram que os novos marcadores SSRs gênicos específicos podem auxiliar na identificação de QTLs e na seleção assistida por marcadores devido à associação dessas marcas com regiões funcionais do genoma da cana.

Sharma et al. (2014) estudaram a diversidade genética de 40 genótipos de cana (34 F_1 s e 6 genitores), por meio de 22 marcadores SSRs. As estimativas do PIC, da homozigosidade observada e da diversidade (Nei) dos locos individuais variaram, respectivamente de 0,15 a 0,67, de 0 a 0,277 e de 0,129 a 0,473. A média estimada do índice de informação de Shannon foi 0,524 e o índice de fixação variou de -0,074 a 1. Segundo os autores, as informações sobre as relações e diversidade genética entre as cultivares, obtidas a partir da análise de agrupamento, poderão ser utilizadas na seleção de genitores no programa de melhoramento.

Que et al. (2014) utilizaram marcadores do tipo códons de inicialização (Scot - *Start Codon Target*) para avaliar a diversidade genética entre 107 acessos de cana-de-açúcar pertencentes a uma coleção local de germoplasma na China. As estimativas do conteúdo de informação de polimorfismo variaram de 0,783 a 0,907, com média de 0,861 e a análise de agrupamento dividiu os acessos em seis grupos. A análise de componentes principais separou os acessos em dois grandes grupos, o das canas domesticadas e o dos acessos introduzidos. Ambos os grupos apresentaram subgrupos, coincidentes com as instituições de onde se

originaram. As informações geradas podem ser utilizadas no manejo do germoplasma, na construção de coleção nuclear, etc.

Do exposto, fica evidente a importância do emprego de marcadores moleculares na avaliação de acessos de coleções de cana-de-açúcar, tanto para fins de conservação de variabilidade genética, quanto para uso aplicado dos recursos genéticos em programas de melhoramento da cultura. É nesse contexto que se insere a presente pesquisa, que visa caracterizar, por meio de marcadores SSRs, 94 genótipos, a maioria deles de espécies selvagens do Complexo *Saccharum*, pertencentes ao banco de germoplasma do Programa Cana do IAC. Ressalte-se que a maior parte desses acessos avaliados é proveniente da CMCAGC, situada em Miami, a qual, segundo Todd et al. (2014), embora contenha germoplasmas diversos e potencialmente úteis para programas de melhoramento, está sendo subutilizada devido ao conhecimento limitado das características dos seus acessos.

Resumidamente, os SSRs são pequenos fragmentos de DNA, compostos por motivos que contêm de 1 a 6 pares de bases. Repetem-se sucessivamente (em *tandem*) no genoma dos indivíduos e são flanqueados por sequências conservadas de DNA, a partir das quais é possível obter iniciadores (*primers*) específicos para que sejam amplificados por PCR (*Polimerase Chain Reaction*) (Wang et al., 1994; Jarne & Lagoda, 1996; Powell et al., 1996; Selkoe & Toonen, 2006; Kalia et al., 2011; Marconi et al., 2011).

Além do uso em estudos de diversidade genética, relações evolutivas, etc., os SSRs têm sido empregados com sucesso em análises de parentesco e paternidade (CHAMBERS & MACAVOY et al., 2000; XAVIER et al., 2014, etc.) e na obtenção de perfis moleculares de cultivares (JANNOO et al. 2001; PAN et al. 2003, MACCHERONI et al., 2007; PAN et al., 2010). Destaque-se que o Programa Cana do IAC tem se utilizado desses marcadores para obtenção de perfis moleculares únicos (*fingerprint*) para identificar genótipos, realizar teste de paternidade, confirmar cruzamentos realizados em cana, entre outros, sendo que todas essas informações ficam armazenadas no banco de dados de perfis moleculares da instituição. Esse fato também contribuiu para a escolha desse tipo de marcador para realização da presente pesquisa, pois, com uso dos mesmos, será possível obter os perfis moleculares dos acessos disponíveis, complementando as informações do banco de dados do Centro de Cana e facilitando a manutenção e o uso desse germoplasma no programa de melhoramento.

Ressalta-se ainda que existem muitos *primers* de SSRs desenvolvidos para o genoma da cana (PAN, 2006) e, inclusive, vários deles localizados em regiões expressas do genoma (EST-SSRs) (PINTO et al., 2004; SINGH et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2009; MARCONI et al., 2011; SILVA et al., 2012), como mencionado anteriormente. Esses

marcadores têm sido eficientes nos estudos de identificação de cultivares, como relatado Jannoo et al. (2001), Cordeiro et al. (2000; 2003), Pan (2003 a, b), Chen et al. (2009), Pan (2010), Pingwu et al. (2012), entre outros.

Nesse contexto, a presente pesquisa visou caracterizar os 94 acessos com base em SSRs, bem como estabelecer os perfis moleculares dos mesmos e introduzir essas informações no banco de dados de perfis moleculares do Centro de Cana do IAC, onde estarão disponíveis para uso dos melhoristas, buscando, desse modo, tornar mais eficiente o programa de melhoramento genético e com isso, reduzir o tempo necessário para obtenção de novas variedades, trazendo benefícios socioeconômicos para o país. Finalmente, deve-se mencionar que, embora os marcadores SNPs (*Single-Nucleotide Polymorphism*) venham ganhando destaque nos estudos com organismos poliploides como a cana, permitindo inclusive que a dosagem dos alelos de cada loco seja determinada (GARCIA et al., 2013), na presente pesquisa, optou-se por trabalhar com os marcadores moleculares do tipo microssatélites (SSRs). Além de possuírem características importantes para estudos de caracterização de germoplasma, como mencionado anteriormente, o uso de SSRs faz parte da rotina de análises do Centro de Cana do IAC, no que diz respeito à estudos de variabilidade genética e de obtenção dos perfis moleculares dos acessos do Banco de Germoplasma de Cana do referido Instituto.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. MATERIAL

Como mencionado anteriormente, o Banco de Germoplasma de Cana do Centro de Cana do IAC é composto por variedades comerciais, clones, introduções de diversas origens, incluindo 17 introduções provenientes de Meringa/Austrália da coleção do *Bureau of Sugar Experiment Stations* (BSES) e cerca de 400 genótipos da Coleção Mundial de Cana-de-açúcar e Gramíneas Correlatas (CMCAGC).

Na presente pesquisa, foram avaliados, por meio de marcadores microssatélites (SSRs), 94 acessos de cana desse Banco de Germoplasma, a maioria deles oriundos da CMCAGC (Tabela 1). A avaliação desses acessos faz parte do processo de estabelecimento de tal coleção no país, bem como do processo de caracterização do banco de germoplasma da instituição. Os genótipos avaliados são exemplares de espécies dos gêneros *Saccharum*, *Erianthus* e *Miscanthus*, todas pertencentes ao Complexo *Saccharum*. Como mencionado previamente, nesta pesquisa, priorizou-se estudar a espécie *S. spontaneum*.

Tabela 1 - Lista dos acessos analisados, com números utilizados para identificação, nomes comuns e respectivas classificações taxonômicas específicas. [Identificações obtidas no GRIN - “*Germplasm Resources Information Network*” (<http://www.ars-grin.gov>)].

| Número e nome do acesso | Espécie* | Número e nome do acesso | Espécie* |
|-------------------------|----------------------|-------------------------|----------------------|
| 1 Dacca | <i>S. spontaneum</i> | 48 Ubadel Natal | <i>S. sinense</i> |
| 2 Djantoe II (2) | <i>S. spontaneum</i> | 49 S 66-097 | <i>S. spontaneum</i> |
| 3 Formosa 4 | <i>S. spontaneum</i> | 50 S 66-105 | <i>S. spontaneum</i> |
| 4 Gugu | <i>S. spontaneum</i> | 51 Coimbatore | X |
| 5 Holes1 | <i>S. spontaneum</i> | 52 SES 092 | <i>S. spontaneum</i> |
| 6 IA 3135 | X | 53 SES 184B | <i>S. spontaneum</i> |
| 7 IK 76-067 | <i>S. spontaneum</i> | 54 SES 090 | <i>S. spontaneum</i> |
| 8 IK 76-049 | <i>S. spontaneum</i> | 55 SES 208 | <i>S. spontaneum</i> |
| 9 IM 76-232 | <i>S. robustum</i> | 56 SES 234 | <i>S. spontaneum</i> |
| 10 IN 84-009 | X | 57 Taiwan spont 072 | <i>S. spontaneum</i> |
| 11 IN 84-011 | <i>S. spp.</i> | 58 SES 323 | <i>S. spontaneum</i> |
| 12 IN 84-021 | <i>S. spp.</i> | 59 SES365 | <i>S. spontaneum</i> |
| 13 IN 84-089 | <i>S. spontaneum</i> | 60 Longchuan (Yunan) | <i>S. spontaneum</i> |

Tabela 1 - Continuação

| Número e nome do acesso | Espécie* | Número e nome do acesso | Espécie* |
|-------------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------|
| 1 Dacca | <i>S. spontaneum</i> | 48 Ubadel Natal | <i>S. sinense</i> |
| 14 IS 76-125 | <i>S. spontaneum</i> | 61 SH 301 | <i>S. spontaneum</i> |
| 15 IS 76-173 | <i>S. spontaneum</i> | 62 SLC 92-32 | <i>S. spontaneum</i> |
| 16 IS 76-192 | <i>S. spontaneum</i> | 63 SM 7916 | <i>S. spontaneum</i> |
| 17 IS 76-196 | <i>S. spontaneum</i> | 64 SLC 92-85 | <i>S. spontaneum</i> |
| 18 M Moentai | <i>S. spontaneum</i> | 65 SLC 92-98 | <i>S. spontaneum</i> |
| 19 P 57-150-4 | <i>Saccharum</i> (híb.) | 66 SLC 92-94 | <i>S. spontaneum</i> |
| 20 PCA SUR 84-01 | X | 67 Taiwan spont 064 | <i>S. spontaneum</i> |
| 21 PCA SUR 84-13 | X | 68 THA 83-171 | <i>S. spontaneum</i> |
| 22 Pin 84-001 | X | 69 PCA SUR 84-08 | X |
| 23 Ponape Wild Slender | <i>S. spontaneum</i> | 70 UM 69-015 | <i>S. spontaneum</i> |
| 24 PPGN 84-08 | X | 71 US 4633 | <i>S. spontaneum</i> |
| 25 Gehra-Bon | <i>S. spontaneum</i> | 72 S 66-084 | <i>S. spontaneum</i> |
| 26 PSOR 84-13 | <i>S. spontaneum</i> | 73 PCAV 84-20 | <i>S. spontaneum</i> |
| 27 S 66-084 | <i>S. spontaneum</i> | 74 SLC 92-82 | <i>S. spontaneum</i> |
| 28 IJ 76-478 | <i>S. officinarum</i> | 75 SES 103 | <i>S. spontaneum</i> |
| 29 SES 033 | <i>S. spontaneum</i> | 76 PQ 84-09 | X |
| 30 SES 084/58 | <i>S. spontaneum</i> | 77 SES 295 | <i>S. spontaneum</i> |
| 31 IN 76-086 | X | 78 IND 81-170 | <i>S. spontaneum</i> |
| 32 SES 196 | <i>S. spontaneum</i> | 79 US 78-519 | <i>S. spontaneum</i> |
| 33 SES197A | <i>S. spontaneum</i> | 80 SES 260 | <i>S. spontaneum</i> |
| 34 IN84-022 | <i>S. spp.</i> | 81 US 78-523 | <i>S. spontaneum</i> |
| 35 SES 297A | <i>S. spontaneum</i> | 82 IK 76-067 | <i>S. spontaneum</i> |
| 36 SES 308A | <i>S. spontaneum</i> | 83 SES 602 | <i>S. spontaneum</i> |
| 37 IS76-186 | <i>S. spontaneum</i> | 84 SES 288 | <i>E. arundinaceum</i> |
| 38 SES 367 | <i>S. spontaneum</i> | 85 US 56-016-01 | <i>S. spp.</i> |
| 39 SES519 | <i>S. spontaneum</i> | 86 US 78-518 | <i>S. spontaneum</i> |
| 40 MatnaShahj | <i>S. barberi</i> | 87 Yacheng #12 | <i>S. spontaneum</i> |
| 41 SLC 92-62 | <i>S. spontaneum</i> | 88 US 74-069 | <i>S. spp.</i> |
| 42 SLC 92-77 | <i>S. spontaneum</i> | 89 PAL 84-01 | <i>S. spontaneum</i> |

Tabela 1 - Continuação

| Número e nome do acesso | Espécie* | Número e nome do acesso | Espécie* |
|-------------------------|----------------------|-------------------------|--------------------------------|
| 43 Philippine Wild | <i>S. spontaneum</i> | 90 PCA SUR 84-03 | <i>S. spontaneum</i> |
| 44 SM 8136 | X | 91 PCVA 84-13 | X |
| 45 Tainan 2n=96 | <i>S. spontaneum</i> | 92 IJ 76-358 | <i>E. arundinaceum</i> |
| 46 PQ 84-04 | X | 93 S spont #28 | <i>S. spontaneum</i> |
| 47 Tongza | <i>S. spontaneum</i> | 94 X-Miscanthus | <i>Miscanthus</i> (híbrido) |

*A letra X indica que não foi encontrada informação sobre o acesso no GRIN.

4.2. MÉTODOS

4.2.1. Coleta de material

Passado o período de quarentena, os 94 genótipos considerados nesse estudo foram propagados vegetativamente, a partir da brotação de gemas contidas em colmos de cana. Os toletes foram plantados em vasos, evitando-se propagação de material selvagem e possível contaminação dos campos de cultivo.

No primeiro bimestre do ano de 2015, foi realizada a coleta de amostras de folhas frescas e sadias desses acessos, as quais foram acondicionadas individualmente em tubos Falcon. Tais tubos foram armazenados em caixa de isopor com gelo e conduzidos ao Laboratório de Genética Molecular do Centro de Cana do IAC, em Ribeirão Preto, SP.

Cada uma dessas amostras, representando um dos 94 genótipos avaliados, foi utilizada para realização das análises moleculares, de acordo com procedimentos listados e descritos a seguir.

4.2.2. Extração de DNA genômico

A extração do DNA genômico total foi realizada de acordo com protocolo de Al Janabi et al. (1999), a partir de cada amostra, contendo cerca de 300 mg de tecido foliar fresco macerados em triturador (Tissuelyser, Quiagen). O DNA foi extraído usando o kit de extração de DNAs da Sigma (GenElute Plant Genomic DNA, Miniprep Kit).

4.2.3. Quantificação do DNA genômico

O DNA genômico foi quantificado em gel de agarose a 0,8%, utilizando-se, como padrão, DNA do fago λ , de quantidade conhecida. O procedimento de eletroforese foi

realizado a 80 volts, por 30 minutos. Os géis foram corados com brometo de etídeo, e visualizados em luz ultravioleta em transluminador. Após a quantificação do DNA estoque, os mesmos foram diluídos a concentração de 10 ng.ml⁻¹.

4.2.4. Amplificação dos locos de microssatélites (SSRs) via PCR (“*Polymerase Chain Reaction*”)

Doze pares de *primers* de microssatélites genômicos desenvolvidos para cana, disponíveis na literatura (MACCHERONI et al. 2007, OLIVEIRA et al. 2009, MARCONI et al. 2011) foram utilizados nesta pesquisa.

As reações de amplificação se deram como descrito por Pinto et al. (2004), porém, com modificações para análise em genotipador de DNA 4300 da LiCor. As reações foram conduzidas em um volume final de 15 µl contendo 25 ng de DNA, tampão 1X (50 mM KCl e 10 mM de Tris-HCL, pH 7,5); 0,1 mM de dNTPs; 2,0 mM de MgCl₂, 0,2 unidades de Taq DNA Polimerase, 0,1 µM de cada par de *primer* (*forward* e *reverse*) marcados com infravermelho (IR) nos comprimentos de 700 nm ou 800 nm. As reações foram colocadas em termociclador (*My Thermocycler, BioRad*), com passo inicial de desnaturação a 94 °C por 5 minutos seguido de 35 ciclos a 95 °C por 45 segundos, temperatura de anelamento específica para cada par de *primer* por 30 segundos e extensão a 72 °C por 30 segundos, finalizando com um ciclo a 72 °C por 1 minuto.

Os produtos de amplificação gerados após reação de PRC marcadas com as fluorescências IR700 e IR800 foram misturados e adicionados 2 uL de tampão formamida 6X da LiCor. Em seguida, procedeu-se a desnaturação a 95 °C, por 5 minutos. Na sequência, as amostras foram então separadas em gel de poliacrilamida desnaturante a 5%, no genotipador de DNA 4300 da LiCor.

4.2.5. Genotipagem e estabelecimento dos perfis moleculares usando o Analisador de DNA 4300 da LiCor®

A análise do perfil de marcas por indivíduo foi feita com uso do programa Saga™ (*Automated AFLP Analysis Software*) da Li-Cor® Biosciences, lembrando que, em poliploides, são observadas várias marcas em um indivíduo por par de primers SSR considerado. O programa Saga™ fez a leitura do tamanho de cada marca (alelo) observada a partir das imagens das análises de eletroforese realizadas em gel de poliacrilamida, geradas no final do processo, um painel, indicando a presença (1) ou ausência (0) de todos os alelos discriminados, resultando no perfil molecular de cada indivíduo. A determinação do tamanho

dos alelos (peso) foi realizada em comparação a padrões de pesos moleculares conhecidos (MWS – *Molecular Weight Standard*, ou “*Ladder*”, em pares de bases), avaliados nos géis de poliacrilamida, juntamente com os indivíduos.

4.2.6. Análise de perfis moleculares

A leitura dos géis de marcadores SSRs não é óbvia, por ser a cana-de-açúcar é um organismo poliploide complexo. Além disso, não é possível determinar a dosagem dos alelos em locos SSRs. Contudo, a genotipagem dos acessos de cana, com base nesse marcador, tem sido realizada com sucesso por meio da anotação presença (1), ou ausência (0) do alelo (banda) por loco. Desse modo, os perfis moleculares de cada genótipo são obtidos a partir da combinação de informações oriundas das leituras dos géis (presença/ausência das bandas) e com auxílio de programas computacionais. Sendo os genótipos diferentes entre si, espera-se que os perfis moleculares dos mesmos também o sejam, permitindo, assim, a identificação de cada genótipo por meio da análise de seu perfil.

Para que isso ocorra de modo eficiente, faz-se necessário que os locos apresentem alto poder discriminatório, sendo informativos na construção dos perfis moleculares. Por esse motivo, após a genotipagem, foram estimados o Conteúdo de Informação de Polimorfismo (PIC_k , *Polymorphic Information Content*) e o Poder Discriminatório (P_k) de cada *primers* (k -ésimo loco), como realizado por Marconi (2011), entre outros. A estimativa do PIC_k foi obtida de acordo com Botstein et al. (1980):

$$PIC_k = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2 - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=1+1}^n 2p_i^2 p_j^2$$

em que p_i é a estimativa da frequência do i -ésimo alelo no loco k sob estudo e $i = 1, 2, \dots, n$, sendo n o número de alelos no loco. A estimativa de P_k para o k -ésimo *primers* foi obtida como em Tessier et al. (1999):

$$P_k = 1 - \sum_{l=1}^L p_l \frac{(Np_l - 1)}{N - 1}$$

em que N é o número total de indivíduos avaliados e p_l é a frequência do l -ésimo perfil observado no k -ésimo loco.

4.2.7. Análise de similaridade genética entre acessos estudados

A partir da matriz de dados binários (zeros e uns) referente aos perfis genotípicos, em que as linhas representam as marcas polimórficas e as colunas os diferentes acessos obtiveram-se as matrizes de similaridade genética com base no índice de Jaccard (SNEATH; SOKAL; 1973).

4.2.8. Avaliação da acurácia das estimativas em função do número de locos utilizados

Para verificar se o número de locos polimórficos empregados na obtenção da matriz de similaridade genética foi suficiente para atingir um nível de acurácia satisfatório, foi utilizado o método de reamostragem *bootstrap* (EFRON & TIBISHIRANI, 1993), do mesmo modo que em (Tivang et al., 1994; Halldén et al., 1994; Garcia et al., 2004, dentre outros). Para tanto, a matriz com dados binários dos 94 genótipos foi reamostrada, considerando diferentes números de locos (bandas). Primeiramente, foram tomadas 1000 amostras *bootstrap* com todos os locos. Em seguida, foram realizadas as reamostragens com redução amostral, ou seja, variando o número de locos, de modo que, para cada número de locos considerados (inclusive para o número de locos total), foram obtidas 1000 amostras *bootstraps* e calculadas, para cada uma delas, novas matrizes de similaridade. Em seguida, com base nessas matrizes, foram computados os valores do coeficiente de variação das medidas de similaridade para cada tamanho amostral (número de locos). Nessa análise de redução amostral, foram considerados diferentes tamanhos amostrais, que variaram em unidades entre si. Ajustou-se uma função exponencial para estimar o número de locos necessários para se obter valores de CV menores ou iguais a 10%, considerados aceitáveis no presente trabalho.

4.2.9. Análise da estrutura da variabilidade genética entre os acessos

A partir da matriz de similaridades genéticas, obteve-se sua matriz complementar, ou seja, a matriz de dissimilaridade genética, a qual foi utilizada para realização das análises multivariadas, que tiveram por finalidade verificar como os genótipos estudados relacionam-se entre si. Foi realizada análise de agrupamento, sendo o dendrograma gerado por meio do método UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages*), e também análise de coordenadas principais (PCoA). Os procedimentos encontram-se detalhadamente descritos em Sneath & Sokal (1973), Manly (1994), entre outros. Todas as análises foram realizadas com emprego do programa R (R Core Team, 2016).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. RESULTADO DAS GENOTIPAGENS

A partir dos 12 pares de *primers* de marcadores SSRs utilizados, foram obtidas 236 marcas, das quais, apenas 6 (“SCB436 pair-0186”, “SCB436 pair-0168”, “SCB423 pair-0300”, “SCB423 pair-0296”, “CV37 pair-0169”, “CV38 pair-0200”) foram monomórficas para ausência de banda (todos os indivíduos apresentaram ausência dessas bandas), tendo sido desconsideradas nas análises subsequentes por não serem informativas. Todos os locos foram polimórficos, com número de alelos informativos variando de 9 (loco CV60) a 28 (loco SCB423), com média de 19,17 alelos por loco (Tabela 2).

Tabela 2 - Locos de microssatélites, com seus respectivos número de alelos, frequência dos alelos mais e menos comuns por loco entre os indivíduos, número de alelos monomórficos, estimativa do Conteúdo de Informação de Polimorfismo (PIC_k), número de perfis por loco, número de indivíduos que apresentaram variação no padrão de bandas por loco, número de perfis com ausência de todos alelos do loco, número de perfis sem leitura (dados faltantes) e estimativa do Poder Discriminatório do loco (P_k).

| | LOCOS | | | | | | | | | | | |
|--|------------|------------|------------|------------|----------|------------|----------|----------|----------|----------|-----------|----------|
| | SCB 381 | SCB 436 | SCB 213 | SCB 423 | CV 37 | SCB 312 | CV 79 | CV 29 | CV 94 | CV 38 | CV 106 | CV 60 |
| Número de alelos* | 21 | 20 (18) | 19 | 30 (28) | 16 (15) | 23 | 26 | 20 | 13 | 27 (26) | 12 | 9 |
| Frequência do alelo menos comum* | 1 | 2 (0) | 1 | 1 (0) | 1 (0) | 5 | 3 | 1 | 3 | 1 (0) | 5 | 3 |
| Frequência do alelo mais comum | 84 | 82 | 68 | 50 | 87 | 50 | 82 | 88 | 74 | 86 | 72 | 91 |
| Frequência de alelos monomórficos | 0 | 2 | 0 | 2 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| Estimativa do PIC_k | 0.8889 | 0.8812 | 0.9234 | 0.9306 | 0.8114 | 0.9433 | 0.9339 | 0.8929 | 0.8640 | 0.8997 | 0.8472 | 0.8099 |
| Nº de perfis | 76 | 67 | 86 | 83 | 39 | 88 | 91 | 73 | 55 | 77 | 57 | 39 |
| Nº de indivíduos (N) ⁺ | 94 | 92 | 88 | 89 | 94 | 90 | 92 | 93 | 90 | 93 | 89 | 93 |
| Nº de perfis com ausência de bandas [§] | 1 | 0 | 0 | 1 | 6 | 2 | 0 | 1 | 2 | 3 | 0 | 0 |
| Nº de perfis faltantes [†] | 0 | 2 | 6 | 5 | 0 | 4 | 2 | 1 | 4 | 1 | 5 | 1 |
| Y | 0.9941 | 0.9878 | 0.9995 | 0.9977 | 0.9401 | 0.9995 | 0.9998 | 0.9911 | 0.9788 | 0.9918 | 0.9852 | 0.9715 |

*Número total de alelos e, entre parênteses, o número de alelos que exibiram variação entre os indivíduos; ⁺Número de indivíduos que apresentaram perfil polimórfico para os alelos no loco, no caso, presença de pelo menos um alelo por loco; [§]perfis com ausência de banda para todos os alelos do loco; [†]perfil sem leitura (dados faltantes).

Um exemplo da variação molecular pode ser vista entre parte dos indivíduos analisados em gel, para o loco SCB381 (Figura 1). Nesse gel, há 47 acessos e 2 padrões de DNA avaliados, sendo que cada coluna visualizada representa um desses 49 genótipos. Observou-se número relativamente elevado de alelos (bandas presentes/ausentes no gel) para esse loco, revelando a variabilidade genética entre os indivíduos avaliados.

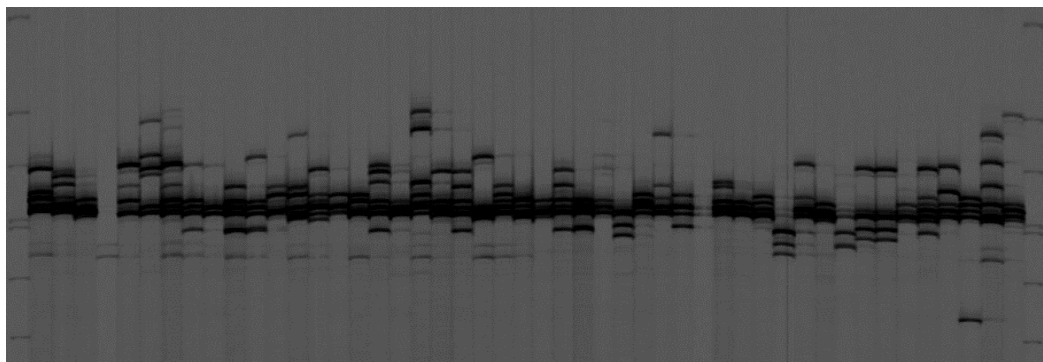


Figura 1 - Genotipagem de 47 indivíduos e dois padrões para o loco SCB381 de SSR.

O número de vezes que um dado alelo esteve presente entre os 94 indivíduos avaliados variou de 1 a 88. Por exemplo, considerando o loco CV29, observou-se que somente o indivíduo representante do acesso PONAPE Wild Slender (*S. spontaneum*) apresentou a banda referente ao alelo “CV29 pair-0170”, enquanto o alelo “CV29 pair-0091” não está presente em apenas cinco dos acessos avaliados: três de *S. spontaneum* (SH301, S66-105, PCAV84-20 e PQ84-09), um de *E. arundinaceus* (IJ76-358) e um (IJ76-358), cuja classificação é desconhecida no GRIN.

Alguns alelos não foram revelados para alguns indivíduos, resultando em dados faltantes. Desse modo, para os locos SCB436, SCB213, SCB423, SCB312, CV79, CV29, CV94, CV38, CV106 e CV60, o número de perfis não identificáveis, chamados de perfis faltantes, dentro de cada loco foi, respectivamente, 2, 6, 5, 4, 2, 1, 4, 1, 5, 1. Assim, por exemplo, não foi possível realizar a leitura no gel para os acessos Gugu e SES197A (ambos *S. spontaneum*) no loco SCB436, o mesmo acontecendo para o acesso SES308A (*S. spontaneum*) no loco CV38. O acesso Gugu apresentou variação somente para os locos 423 e CV38, não sendo identificável de acordo com os locos SCB436, SCB213, SCB312, CV79, CV29, CV106 e CV60 e apresentou perfil com zeros para os locos SCB381, CV37 e CV94. Apenas para os locos SCB381 e CV37 não foi observado nenhum perfil faltante.

Alguns indivíduos também apresentaram perfis somente com ausência das bandas para um ou mais locos, ou seja, ausência de bandas referentes a todos os alelos para o(s)

referido(s) loco(s). Como mencionado acima, o acesso Gugu apresentou esse tipo de perfil para três locos. Outro exemplo foi o híbrido de *Miscanthus*, para o loco CV37. Não foram encontrados perfis contendo somente ausência de bandas para os locos SCB436, SCB213, CV79, CV106 e CV60.

O número mínimo de indivíduos avaliados por loco variou de 88 (loco SCB213) a 94 (locos SCB381 e CV37) e, desconsiderando os perfis faltantes por loco, os valores estimados do PIC (conteúdo de informação de polimorfismo) variaram de 0,0208 (locos “CV37 pair-0164”, “CV37 pair-0144”, “381 pair-0241”) a 0,3750 (“CV106 pair-0157”), com média geral estimada em 0,2237.

Os valores estimados do Conteúdo de Informação de Polimorfismo (PIC) variaram de 0,8099 (loco CV60) a 0,9433 (loco SCB312), com média de 0,8855, sendo relativamente elevados quando comparados aos encontrados por Pinto et al. (2004; 2006), Marconi et al. (2011) e Que et al. (2014), cujas estimativas da média de PIC foram, respectivamente, 0,66, 0,73 (EST-SSR) e 0,82 (gSRR), 0,69 e 0,86. Isso indica que existe elevada variabilidade genética presente entre esses acessos e que o conjunto de marcadores utilizados foi eficiente em detectá-la.

As estimativas do Poder Discriminatório também foram bastante elevadas, variando de 0,9401 (loco CV37) a 0,9998 (loco CV79), com média de 0,9864 entre locos. Isso indica que os *primers* utilizados foram muito eficientes na discriminação entre os acessos. De fato, o loco CV79 permitiu fazer a distinção entre 91 dos 94 genótipos avaliados, não tendo sido possível diferenciar os acessos SL92-62 e SL92-77, por apresentarem o mesmo perfil molecular para esse loco, e Gugu, cujo perfil não foi obtido (dados faltantes). No entanto, ao considerar o loco SCB423, juntamente com o CV79, foi possível discriminar todos os 94 perfis. Esses resultados indicam a eficiência elevada desse conjunto de marcadores em diferenciar tais genótipos, reiterando a utilidade dos mesmos no estabelecimento dos perfis moleculares (*fingerprints*) dos acessos do banco de germoplasma de cana do IAC. Os dados gerados na presente pesquisa serão incorporados no banco de dados de perfis moleculares do Centro de Cana do IAC e poderão ser prontamente utilizados tanto na manutenção quanto no uso desses recursos genéticos.

5.2. ANÁLISE DA SIMILARIDADE GENÉTICA

Com base na leitura dos géis (presença/ausência de bandas), foi gerada a matriz binária de zeros e uns, utilizadas para o cálculo das similaridades entre genótipos. A partir dessa matriz, foi verificado se o número de marcas foi suficiente para calcular as estimativas de

similaridade genética com acurácia adequada. Considerando as 230 marcas polimórficas, a estimativa da mediana das estimativas dos coeficientes de variação (CVs), calculados a partir de 1000 amostras *bootstrap* da matriz de similaridade genética, foi inferior a 5,91% e, portanto, dentro do limite recomendado na literatura (10%). Isso pode ser visualizado no gráfico do decaimento dos valores estimados do CVs, considerando 1000 reamostragens *bootstrap*, realizadas com diferentes números de marcas (Figura 2). Nota-se ainda que, para atingir tal nível de acurácia recomendado na literatura, cerca de 48 marcas polimórficas já seriam suficientes.

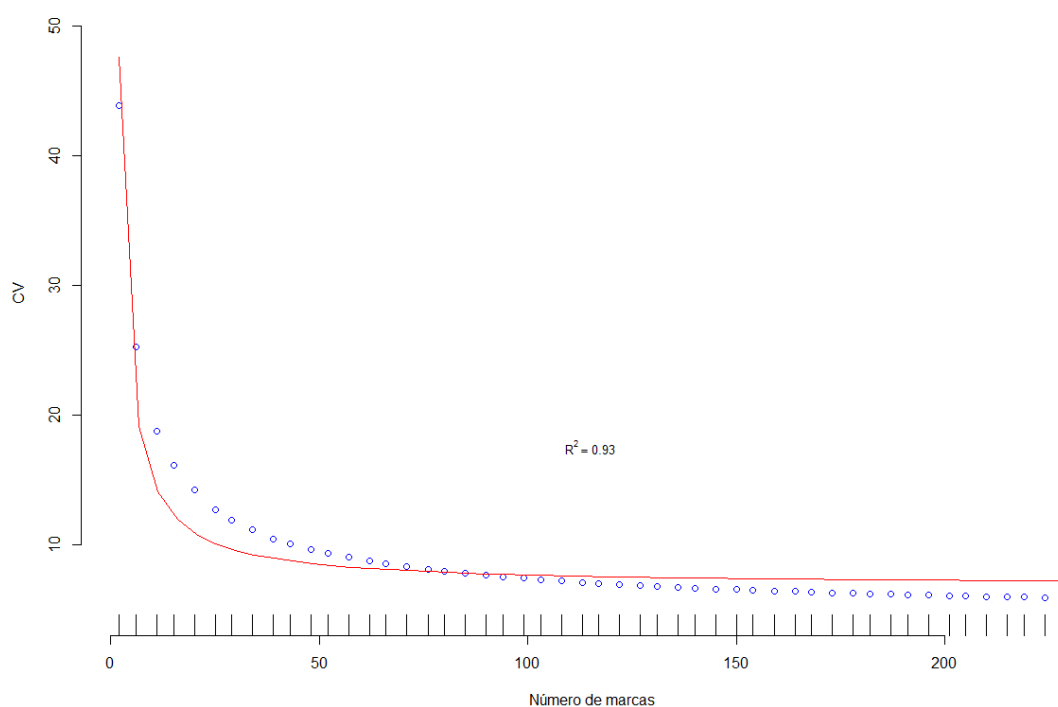


Figura 2 - Curva dos coeficientes de variação para diferentes números de marcas consideradas.

Como supracitado, a partir da matriz binária composta pelos perfis genotípicos dos acessos, foram obtidas as estimativas de similaridade genética entre os pares de genótipos, de acordo com o índice de Jaccard, gerando, assim, uma matriz de similaridades entre os 94 indivíduos, a partir da qual foi obtida sua matriz complementar, que contém as dissimilaridades genéticas entre genótipos.

A menor dissimilaridade genética (0,2031) foi encontrada entre os indivíduos SLC 92-62 e SLC 92-77, ambos representantes das espécies *S. spontaneum*, acessos que apresentaram perfis moleculares idênticos para o loco CV79, por exemplo. Por outro lado, as

maiores dissimilaridades (1,0000) foram observadas entre o acesso Gugu e os genótipos Pal 84-01, SES 308A, SES 602, SLC 92-82 e US 78-519, também todos pertencentes a tal espécie. A dissimilaridade média foi de 0,6788, indicando presença expressiva de variabilidade genética entre os acessos avaliados. Esse fato fica evidente ao comparar tal resultado com outros disponíveis na literatura, como os mencionados a seguir. Valores semelhantes foram encontrados por outros autores. Ao estudarem clones de *S. officinarum*, Lu et al. (1994b) obtiveram estimativa da similaridade média no valor de 0,61. Lima et al. (2002) encontraram estimativas de similaridade genética variando de 0,28 a 0,89, com média de 0,47. Sheji et al. (2006) avaliaram 40 clones de *S. spontaneum* provenientes de quatro regiões geográficas da Índia e encontraram estimativa de distância genética entre os acessos entre 29,8 e 60,0. Também avaliando variedades indianas, Nair et al. (2002) estimaram a distância genética média entre variedades indianas de cana em 0,29. Pan et al. (2004) encontraram estimativas de similaridade genética variando de 0,61 a 0,75 entre clones de *S. spontaneum*. Suman et al. (2008) avaliaram genótipos do Complexo *Saccharum* e obtiveram estimativas de similaridades genéticas variando de 0,60 a 0,96, com média de 0,79. Parida et al. (2009) encontraram, entre representantes do complexo *Saccharum*, estimativas de diversidade genética entre 0,16 e 0,82, com média de 0,44. As estimativas da similaridade genética entre clones e variedades de cana avaliados por Creste et al. (2010) foi, em média, de 0,675, 0,655 e 0,522 com base em marcadores AFLPs, TRAPs e SSRs, respectivamente.

Uma vez que a maioria dos acessos avaliados pertence à espécie *S. spontaneum*, os resultados obtidos na presente pesquisa vêm corroborar o fato que essa espécie apresenta elevado nível de variabilidade quando comparada com as demais espécies do Complexo *Saccharum*, como mencionado por Lu et al. (1994b), Aitken et al. (2006), entre outros.

O elevado nível de variabilidade observada entre os acessos estudados indica que os mesmos podem contribuir para ampliar a base genética das cultivares de cana. Além disso, essa diversidade deve ser preservada no banco de germoplasma, podendo os acessos ser utilizados como fonte de alelos de que venham a contribuir com o melhoramento de características de interesse.

5.3. ESTUDO DA ESTRUTURA DA VARIABILIDADE GENÉTICA

A partir da matriz de dissimilaridades genéticas, foi construído o dendrograma (UPGMA), permitindo que as relações intergenotípicas contidas nessa matriz pudessem ser

expressas visualmente (Figura 3). A estimativa da dissimilaridade média entre os acessos foi tomada como ponto de corte para estabelecimento dos grupos.

Com base no dendrograma, observa-se a formação de 10 grupos: **G-I** é formado pela variedade Gugu, que é a mais divergente de todas as variedades. Trata-se de um acesso de *S. spontaneum*, antigo e de origem africana; **G-II** contém somente o híbrido de *Miscanthus*, único representante do gênero, o que vem a corroborar a classificação taxonômica que o distingue dos representantes das outras espécies do Complexo *Saccharum*; **G-III** é composto pela variedade SLC 92-82, sendo que todas as demais variedades SLC estão alocadas no grupo **G-VII**. De acordo com o GRIN, as variedades SLC consideradas nesse trabalho foram todas doadas pelo Sri Lanka e, como a origem é semelhante (todas SLC, do Sri Lanka) não foi encontrada explicação para o fato de somente a SLC 92-82 ter se destacado das demais. O grupo **G-IV** foi formado por espécies distintas, mas todas enviadas ao GRIN pelo oriente: IS 76186 (*S. spontaneum*), vinda da Indonésia, Matna Shahj (*S. barberi*), proveniente da Índia, SES 197A (*S. spontaneum*), vinda da Índia e SES 288 (*E. arundinaceum*) também vinda da Índia. O acesso PAL 84-01 também foi bastante diferente dos demais, sendo o único componente do grupo **G-V**. Trata-se de um exemplar de *S. spontaneum*, proveniente das Filipinas. O grupo **G-VI** é formado por Pin 81-001 (*S. spontaneum*). No grupo **G-VII**, juntamente com as variedades SLC que não foram alocadas no **G-III**, encontram-se outros acessos de *S. spontaneum*: Taiwan spont. 72, enviada por Taiwan, possivelmente sendo um híbrido; SH-301, SES 602 e SES 103, enviadas pela Índia; e US 78-523, enviada pelo Paquistão. Os grupos **G-VIII** e **G-IX** contêm somente variedades SES, todas de *S. spontaneum*, oriundas da Índia. No último grupo (**G-X**), encontram-se todos os demais acessos, incluindo o outro acesso de *E. arundinaceum* (IJ 76-358).

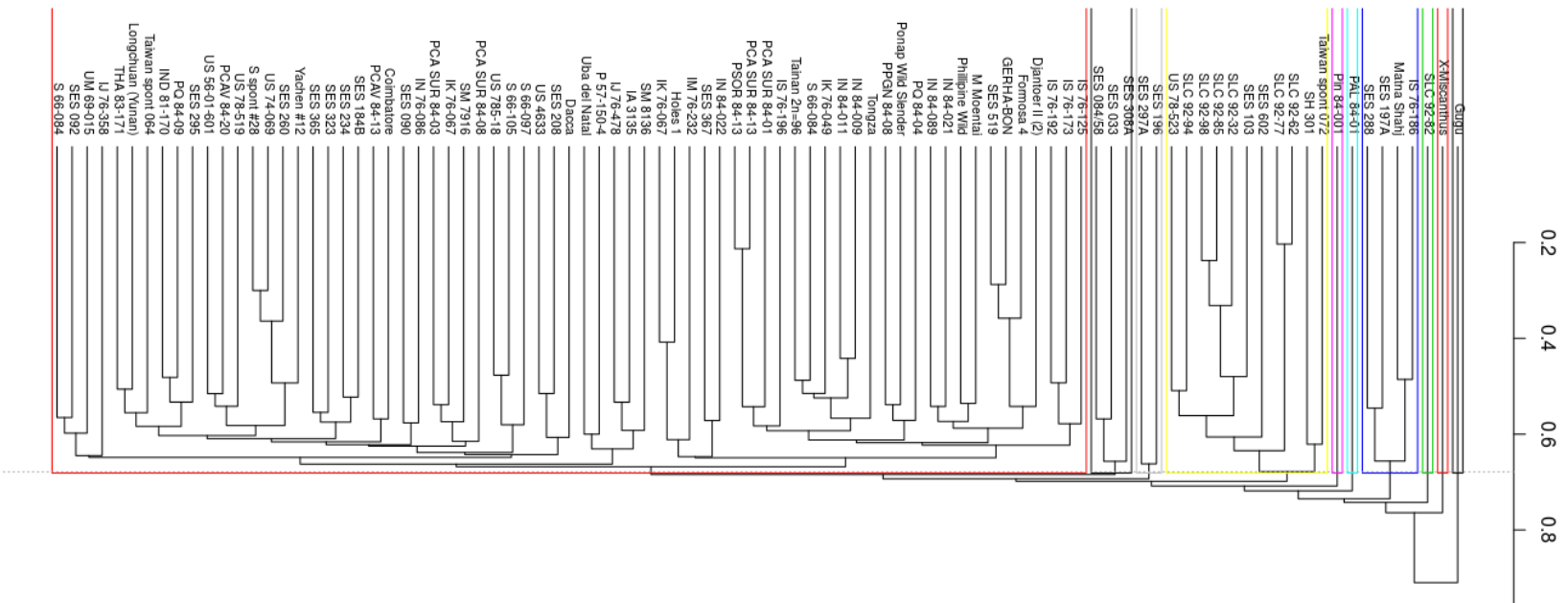


Figura 3 - Dendrograma construído com método UPGMA, a partir das dissimilaridades genéticas entre pares de acessos, calculadas como $d_{(x,y)} = 1 - J_{(x,y)}$, em que $J_{(x,y)}$ é a estimativa do índice de similaridade de Jaccard entre os acessos x e y .

Embora tenham sido formados dez grupos considerando como ponto de corte a estimativa de dissimilaridade média, eles não são compactos e a diferenciação entre eles não é tão evidente. Como a variabilidade genética é relativamente elevada (altos valores das estimativas do PIC de cada loco) e está dispersa entre os acessos, esse conjunto de genótipos parece caracterizar um painel de cana que, por conter em sua maioria espécies cujas características que lhes conferem perfil energético, pode ser considerado um painel inicial de cana para bioenergia, bem como uma coleção nuclear composta por acessos com esse tipo de perfil. Um painel como esse tem muito valor em termos de recursos genéticos. A completa caracterização do mesmo, via avaliações fenotípicas, citogenéticas, com marcadores que permitam realizar a dosagem de alelos por loco como em Serang et al. (2012), a realização de mapeamento associativo de caracteres de interesse para o melhoramento, etc. traria informações muito importantes para o melhoramento genético da cultura, bem como para a manutenção e uso desse germoplasma.

Com base na análise de coordenadas principais (PCoA), realizada a partir da matriz de dissimilaridade entre os acessos, vê-se padrão mais ou menos semelhante ao encontrado na análise de agrupamento, pois os genótipos não se diferenciam claramente entre si, exceto por alguns indivíduos que se destacam dos demais. Os dois primeiros autovetores produzidos pela PCoA acumularam 10,23% da variação contida nessa matriz. Verifica-se que os genótipos mais similares (SLC 92-62 e SLC 92-77) estão praticamente sobrepostos no *biplot* construído com esses dois vetores, e que alguns acessos mais divergentes se encontram destacados no gráfico, como no caso de Gugu e de SLC 92-82 (Figura 4). No entanto, o híbrido de *Miscanthus*, que formou um grupo separado no dendrograma, está agrupado com vários outros acessos no *biplot*.

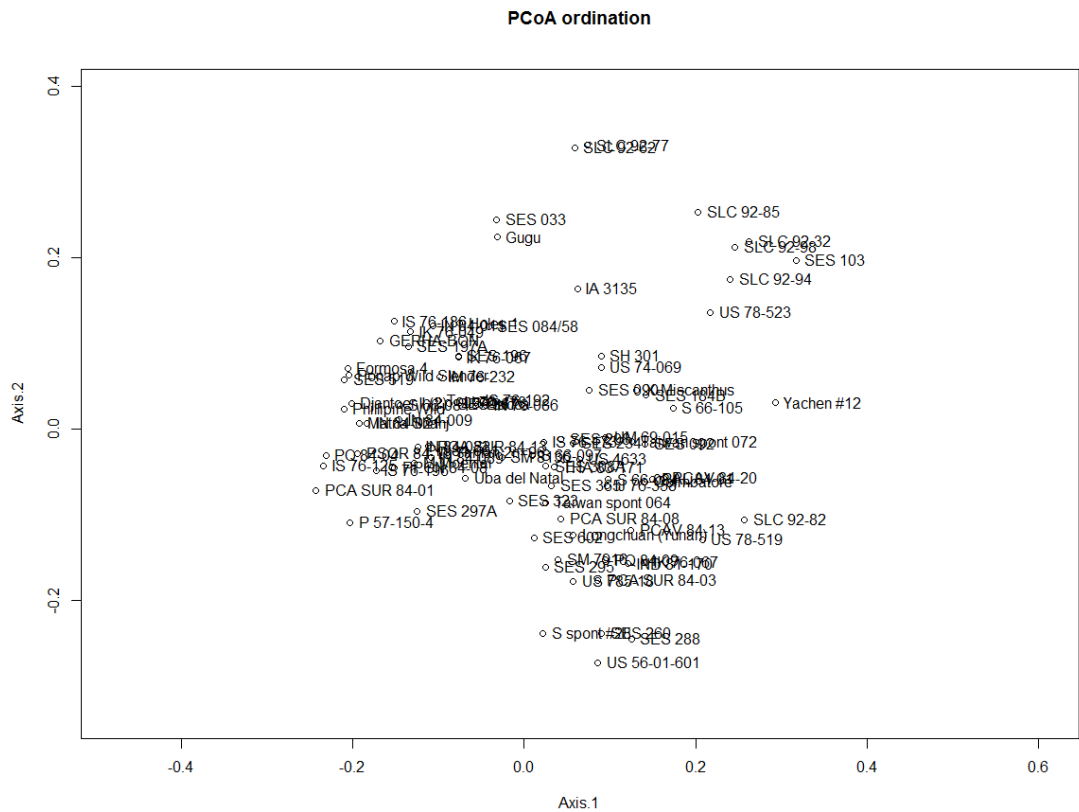


Figura 4 - Biplot com eixos 1 e 2 da Análise de Coordenadas Principais a partir da matriz de dissimilaridade genética.

De modo geral, observa-se que os métodos utilizados foram adequados para analisar a variabilidade genética desses acessos. Observa-se que existe considerável variabilidade genética entre eles, que pode ser aproveitada pelos programas de melhoramento para ampliar a base genética da cana cultivada e para introduzir alelos que favoreçam a expressão de características de interesse. Por ser composto por acessos de diferentes espécies do Complexo *Saccharum*, com predomínio de *S. spontaneum*, esse conjunto de genótipos deve conter alelos que favoreçam a obtenção de novas variedades com perfil energético, voltadas para a produção de etanol celulósico com cogeração de energia elétrica, além de alelos relacionados à tolerância/resistência a estresses bióticos e abióticos. A forma como a variabilidade está representada e estruturada nesse conjunto de genótipos sugere de que os mesmos constituam um painel de cana de perfil energético, com grande valor em termos de preservação de recursos genéticos e de uso no melhoramento da cana. Estudos adicionais sobre esse painel, que pode inclusive ser ampliado, devem ser conduzidos, permitindo caracterização mais ampla do mesmo, visando estabelecimento de estratégias de conservação e uso da variabilidade genética nele contida.

6. CONCLUSÕES

Os objetivos do trabalho puderam ser atendidos ao final do mesmo. Desse modo:

a) foram caracterizados 94 acessos do Complexo *Saccharum*, por meio de SSRs, presentes no Banco de Germoplasma do Centro de Cana do IAC;

b) foi encontrada alta variabilidade genética relativamente elevada entre os acessos e análise de agrupamento os alocou em dez grupos, não tão claramente distintos. A análise de PCoA também não revelou grupos evidentes. Desse modo, os acessos avaliados podem ser considerados como um painel genótipos para cana com perfil energético e, como uma coleção nuclear, que pode ser empregada no estabelecimento de estratégias de conservação e uso desses recursos genéticos;

c) os perfis moleculares dos acessos estudados e as informações obtidas nessa pesquisa estão disponíveis, podendo auxiliar na manutenção e uso desse germoplasma. Poderão ser usadas, por exemplo, no direcionamento de hibridações, na identificação de genótipos nas diversas fases do programa de melhoramento, entre outros;

d) é importante que a caracterização desse germoplasma, por meio de avaliações fenotípicas, citogenéticas, com outros tipos mais informativos de marcadores moleculares, entre outras, seja continuada. Com isso, será possível, futuramente, a realização, por exemplo, de mapeamento associativo de características de interesse e inclusive, de seleção assistida, etc.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGARWAL, M.; SHRIVASTAVA, N.; PADH, H. Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. **Plant Cell Rep**, v.27, p.617-631 , 2008.

AITKEN, K. S. et al. *Saccharum officinarum* and comparison with sugarcane cultivars. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.57, n.11, p.1167-1184, 2006.

AITKEN, K.; McNEIL, M. Diversity Analysis. In: HENRY, R.; CHITTARANJAN, K. (Eds.) **Genetics, Genomics and Breeding of Sugarcane**. CRC Press, 2010. Chap. 3, p.19-42.

AL-JANABI, S.M.; FORGET, L.; DOOKUN, A. An improved and rapid protocol for the isolation of polysaccharide- and polyphenol-free sugarcane DNA. **Plant Molecular Biology Reports**, v.17, n.3, p.1-8, 1999.

ALMEIDA, C. M. A.; LIMA, S. E. N.; LIMA, G. S. A.; BRITO, J. Z.; DONATO, V. M. T. S.; SILVA, M. V. Caracterização molecular de cultivares de cana-de-açúcar utilizando marcadores ISSR. **Ciênc. Agrotec.** v.33, p.1771-1776, 2009. Edição Especial.

ALWALA, S.; et al. Target region amplification polymorphism (TRAP) for assessing genetic diversity in sugarcane germplasm collections. **Crop Sci**, v.46, p.448-455, 2006.

ALWALA, S. & KIMBEND, C.A. Molecular genetic linkage mapping in *Saccharum*: strategies, resources, and achievements. In: HENRY, R.; CHITTARANJAN, K. (Eds.) **Genetics, Genomics and Breeding of Sugarcane**. CRC Press, 2010. Chap.5, p.69-96, 2010.

ARCENEUX, G. Cultivated sugarcane of the worlds and their botanical derivation. **Proc. Int. Soc. Sugar Cane Technol.** Vo.12, p. 844-854. 1967

AUSTRALIAN GOVERNMENT. The Biology and Ecology of Sugarcane (*Saccharum* spp. hybrids) in Australia, 2004. Disponível em:

<[http://www.ogrt.gov.au/internet/ogrt/publishing.nsf/Content/sugarcane-3/\\$FILE/biologysugarcane.pdf](http://www.ogrt.gov.au/internet/ogrt/publishing.nsf/Content/sugarcane-3/$FILE/biologysugarcane.pdf)> Acessado em: 14/08/2016.

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

BESSE, P; et al. Assessing genetic diversity in a sugarcane germplasm collection using an automated AFLP analysis. **Genetic**, v.104, p.143-153, 1998.

BOTSTEIN, D. et al. **Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms**. *Am J Hum Genet*, v.32, p.314-331, 1980.

BRASIL. 2016. Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar. Safra 2016/2017. **Primeiro levantamento (Abril/2016)**. Companhia Nacional de Abastecimento. – Brasília: Conab 24/05/2016.

BRASILEIRO, B. P. et al. Genetic diversity in sugarcane varieties in Brazil based on the Ward-modified location model clustering strategy. *Genet. Mol. Res.*, v.13, n.1, p.1650-1660, 2014.

BREMER, G. On the somatic chromosome numbers of sugarcane forms of endogenous cane. **Proc ISSCT**, v.4, p.30, 1932.

BREMER, G. Problems in breeding and cytology of sugarcane. IV. **The origin of the increase of chromosome number in species hybrids of *Saccharum***. *Euphytica*, Holanda, v.10, p. 325-342, 1961.

CAI, Q.; et al. A preliminary assessment of the genetic relationship between *Erianthus rockii* and the “*Saccharum* complex” using microsatellite (SSR) and AFLP markers. **Plant Sci**, v.169, p.976–984, 2005a.

CAI, Q. et al. Verification of the introgression of *Erianthus arundinaceus* germplasm into sugarcane using molecular markers. **Plant Breeding** v.124, p.322-328, 2005b.

CHAMBERS, G. K.; MacAVOY, E. Microsatellites: consensus and controversy. **Comparative Biochemistry and Molecular Biology**, v.126, p. 455-476, 2000.

CHANG, D.; et al. SRAP analysis of genetic diversity of nine native populations of wild sugarcane, *Saccharum spontaneum*, from Sichuan, China. **Genetics and Molecular Research**, v.11, n.2, p.1245-1253, 2012.

CHEAVEGATTI-GIANOTTO, A.; et al. Sugarcane (*Saccharum x officinarum*): a reference study for the regulation of genetically modified cultivars in Brazil. **Trop Plant Biol**, vol.4, p.62-89, 2011.

CHEN, H.; et al. Research on genetic diversity and phylogeny of *Saccharum spontaneum* L. in China. **Acta Agron Sin**, v.27, n.5, p.645-652, 2001.

CHEN, P. H.; et al. SSR marker-based analysis of genetic relatedness among sugarcane cultivars (*Saccharum* spp. hybrids) from breeding programs in China and others countries. **Sugar Technology**, v.11, p. 347-354, 2009.

CORDEIRO, G. M.; TAYLOR, G. O.; HENRY, R. J. Characterisation of microsatellite markers from sugarcane (*Saccharum* sp.), a highly polyploidy species. **Plant Science**, v.155, p.161-168, 2000.

CORDEIRO, G. M. et al. Microsatellite markers from sugarcane (*Saccharum* spp.) ESTs cross transferable to *erianthus* and *sorghum*. **Plant Science**, v.160, p.1115-1123, 2001.

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

CRESTE, S. et al. Comparison of AFLP, TRAP and SSRs in the estimation of genetic relationship in sugarcane. **Sugar Tech**, v.12, p.150-154, 2010.

CRONQUIST, A. **An Integrated System of Classification of Flowering Plants**. New York: Columbia University Press, 1981.

DANIELS, J. & DANIELS, C. A. Geographical, Historical and Cultural Aspects of the Origin of the Indian and Chinese Sugarcanes *S. barberi* and *S. sinense*. **Sugarcane Breeding Newsletters**, v. 36, p. 4–23, 1975.

DANIELS, J.; ROACH, B. T. Taxonomy and Evolution. In: D. J. Heinz (Ed.). **Sugarcane improvement through breeding**, v. 11, p. 7-84, 1987.

D'HONT, A.; et al. A molecular approach to unraveling the genetics of sugarcane, a complex polyploid of the *Andropogoneae* tribe. **Genome**, v.37, n.2, p.222-230, 1994.

D'HONT, A.; et al. Identification and characterisation of sugarcane intergeneric hybrids, *Saccharum officinarum* x *Erianthus arundinaceus*, with molecular markers and DNA *in situ* hybridisation. **Theor Appl Genet**, v.91, p.320-326, 1995.

D'HONT A., et al. Characterisation of the double genome structure of modern sugarcane cultivars (*Saccharum* spp) by molecular cytogenetics. **Mol. Gen. Genet**, v. 250, p. 405-413, 1996.

D'HONT, A. et al. Determination of basic chromosome numbers in the genus *Saccharum* by physical mapping of ribosomal RNA genes. **Genome**, Canada, v.41, p. 221-225, 1998.

D'HONT, A.; GLASZMANN, J. C. Sugarcane genome analysis with molecular markers: a first decade of research. **Proc. Int. Soc. Sugar Cane Technol.**, v.24, p.556-559, 2001.

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

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

EFRON, B.; TIBSHIRANI, R. J. **An Introduction to the Bootstrap**. Londres: Chapman & Hall/CRC, 1993.

FAN, Y. H. et al. RAPD analysis of *Saccharum spontaneum* from different ecospecific colonies in Yunnan. **Acta Botanica Yunnanica**, v.23, n.3, p.298-308, 2001.

GARCIA, A. A. F. et al. Comparison of RAPD, RFLP, AFLP and SSR markers for diversity studies in tropical maize inbred lines. **Genet. Mol. Biol.**, São Paulo, vol. 27 n. 4, 2004.

GARCIA, Antonio AF et al. SNP genotyping allows an in-depth characterisation of the genome of sugarcane and other complex autopolyploids. **Scientific reports**, v. 3, 2013.

GERBENS-LEENES, W.; HOEKSTRA, A. & MEER, T. H. The water footprint of bioenergy. **PNAS**, v.106, n.25, p.10219 –10223, 2009.

GOES, T. "A energia que vem da cana-de-açúcar." Brasília: **EMBRAPA**, 2008.
<http://biomassaworld.com.br/wp-content/uploads/2016/04/a-energia-que-vem-da-cana.pdf>

GRIVET, L.; et al. A review of recent molecular genetics evidence for sugarcane evolution and domestication. **Ethnobotany Research and Applications**, v.2, p.9-17, 2004.

HÁLLDEN, C. et al. Evaluation of RFLP and RAPD markers in a comparison of *Brassica napus* breeding lines. **Theoretical and Applied Genetics**, Alemanha, v.88, p.123-128, 1994.

HAN, Z.; et al. Characteristics, development and mapping of *Gossypium hirsutum* derived EST-SSRs in allotetraploid cotton. **Theor Appl Genet**, vol.112, p.430-439, 2006.

HENRY, R.J. Basic information on the sugarcane plant. In: HENRY, R.; CHITTARANJAN, K. (Eds.) **Genetics, Genomics and Breeding of Sugarcane**. CRC Press, 2010. Chap. 1, p.1-7.

HOANG, N. V.; et al. Potential for Genetic Improvement of Sugarcane as a Source of Biomass for Biofuels. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v.3, p.182, 2015

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

JACKSON, P. A. et al. Utilization of wild canes from China. **Proc. Int. Soc. Sugar Cane Technol.**, Vol. 27, 2010.

JANNOO, N.; et al. Molecular investigation of the genetic base of sugarcane cultivars. **Theory Apply Genetic**, 1999.

JANNOO, N.; FORGET, L.; DOOKUN, A. Contribution of microsatellites to sugarcane breeding program in Mauritius. In: XXIV Congress, 2001, Brisbane. **International Society of Sugar Cane Technologists**. Brisbane, 2001. p. 637-639.

JARNE, P.; LAGODA P.J.L. **Microsatellites: from molecules to populations and back**. *Tree*, v. 11, p. 424-429, 1996.

KALIA, R.K.; et al. Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. **Euphytica**, v.177, p. 309-334, 2011.

LANDELL, M. G. A.; SILVA, M. A. As estratégias de seleção de cana em desenvolvimento no Brasil. **Visão Agrícola**, v.1, p. 18-23, 2004.

LANDELL, M. G. A.; BRESSIANI, J. A. Melhoramento genético e manejo varietal. In: DINARDO-MIRANDA, L. L.; VASCONCELLOS, A. C. M.; LANDELL, M. G. A. (Org.). **Cana-de-açúcar**. 1ed. Campinas: Instituto Agronômico de Campinas, 2008, p. 101-156, v.1.

LEITE, R. C. C. & LEAL, M. R. L. V. O biocombustível no Brasil. **Novos Estudos**, 78: 15-21, 2007.

LiCor. The LI-COR® 4300 System. An Integrated and Comprehensive System. 7p. Disponível em: www.licor.com. Acessado em 14/10/2016.

LIMA, M. L. A.; et al. Analysis of genetic similarity detected by AFLP an coefficient of parentage among genotypes of sugar cane (*Saccharum* spp.). **Theor Appl Genet**, v.104, p.30-38, 2002.

LU, Y. H.; et al. Relationships among ancestral species of sugarcane revealed with RFLP using single copy maize nuclear probes. **Euphytica**, v.78, p.7-18, 1994a.

LU, Y. H.; et al. Molecular diversity and genome structure in modern sugarcane varieties. **Euphytica**, v.78, p.217-226, 1994b.

MACCHERONI, W.; et al. **Development of a dependable microsatellite-based fingerprinting system for sugarcane**. In: Proceedings International Society Sugar Cane Technologists. Durban, 26, 2007.

MANLY, B. F. J. **Multivariate statistical methods a primer**. 2ª edição. Londres: Chapman & Hall, 1994.

MARCONATO, M.; SANTINI, G. A. Biomassa como fonte de energia no Brasil. In: **CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA**, 2008, São José dos Campos. **Anais**. São José dos Campos: UNESP, 2008.

MARCONI, T. G.; et al. Functional markers for gene mapping and genetic diversity studies in sugarcane. **BMC Research Notes**, v.4, p.264, 2011.

MATSUOKA, S.; GARCIA, A. A. F.; ARIZONO, H. Melhoramento da cana-de-açúcar. In: BORÉM, A.(Ed), **Melhoramento de espécies cultivadas**. 2 ed. Viçosa, UFV, 1999, p. 205-251.

MORETTI, Edvaldo Cesar. Bioenergia - preservar a natureza para salvar a tecnologia. **Premissas**, v. 1, n. 2, p. 22-32, 2010.

MUKHERJEE, S. K. Origin and distribution of *Saccharum*. **Botanical Gazette**, Chicago, v. 119, p. 55-61, 1957.

NAIR, N.V. ; et al. Molecular diversity in Indian sugarcane cultivars as revealed by randomly amplified DNA polymorphisms. **Euphytica**, v.127, n.2, p.219-225, 2002.

OLIVEIRA, K. M.; et al. Characterization of new polymorphic functional markers for sugarcane. **Genome**, v.52 p. 191-209, 2009.

PAN, Y. B.; et al. Application of microsatellite and RAPD fingerprints in the Florida sugarcane variety program. **Sugar Cane International**, p.19-28, 2003a.

PAN, Y. B.; et al. Molecular genotyping of sugarcane clones with microsatellite DNA markers. **Maydica**, v.48, p.319-329, 2003b.

PAN, Y. B.; et al. An assessment of the genetic diversity within a collection of *Saccharum spontaneum* L. with RAPD-PCR . **Genetic Resources and Crop Evolution**, v.51, p.895-903, 2004.

PAN, Y. B. Highly Polimorphic Microsatelite DNA Markers for Sugarcane Germplasm Evaluation and Variety Identity Testing. **Sugar Technology**, v. 8, p. 246-256. 2006.

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

PARIDA, S. K.; et al. Informative genomic microsatellite markers for efficient genotyping applications in sugarcane. **Theor Appl Genet** ., v.118, n.2, p.327-338, 2009.

PINGWU, L.; YOUXION, Q.; PAN, Y. B. Highly polymorphic microsatellite DNA markers for sugarcane germplasm evaluation and variety identity testing. **Sugar Technology**, v. 13, p.129-136, 2012.

PINTO, L. R.; et al. Survey in the sugarcane expressed sequence tag database (SUCEST) for simple sequence repeats. **Genome**, v.47, p. 795-804, 2004.

PINTO, L. R.; et al. Characterization of novel sugarcane expressed sequence tag microsatellites and their comparison with genomic SSRs . **Plant Breeding**, v.125, p.378-384, 2006.

PIPERIDIS G.; D'HONT, A. Chromosome composition analysis of various Saccharum interspecific hybrids by genomic in situ hybridization (GISH) Proc Int Soc Sugcane Technol, v.24 p. 565–566, 2001.

PIPERIDIS, G.; PIPERIDIS, N.; D'HONT, A. (2010a). Molecular Cytogenetics. In Henry, R. J., & Kole, C. (Eds.). **Genetics, genomics and breeding of sugarcane**. p.9-16, 2010.

POWELL, W.; MACHRAY, G. C.; PROVAN, J. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. **Trends Plant Sci**, v.1, p.1021-1026, 1996.

QUE, Y.; et al. Genetic analysis of diversity within a Chinese local sugarcane germplasm based on Start Codon Targeted Polymorphism. **BioMed Research International**, vol. 2014, 2014. Disponível em: <https://naldc.nal.usda.gov/catalog/58974> . DOI: 10.1155/2014/468375. Acessado em 07/11/2016.

R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Disponível em: <<http://R.project.org/>>. Acessado em 22/06/2016.

ROACH, B. T.; DANIELS, J. A review of the origin and improvement of sugarcane. In: COPERSUCAR INTERNATIONAL SUGARCANE BREEDING, 1. 1987. **Workshop**. 1. 1987. p.1-31.

ROSA, J.R.B.F. **Análise do desequilíbrio de ligação e da estrutura populacional do germoplasma brasileiro de cana-de-açúcar**. 2011. 97 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Programa de Pós-Graduação, ESALQ/USP, Piracicaba, 2011. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11137/tde-09022012-160722/pt-br.php>. Acesso em: 20/06/2016.

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

SELKOE, K. A.; TOONEN, R. J. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. **Ecology Letters**, v.9, p.615-629, 2006.

SELVI, A.; et al. Evaluation of maize microsatellite markers for genetic diversity analysis and fingerprinting in sugarcane. **Genome**, v.46, p.394-403, 2003.

SERANG, O.R.; MOLLINARI, M.; GARCIA, A.A.F. Efficient exact maximum a posteriori computation for bayesian SNP genotyping in polyploids. **PLoS One**, v.7, n. 2, p. e30906, 2012.

SHANTHI, R. M.; et al. Genic SSRs from *Saccharum officinarum* in WRKY and stress transcription factors to use them as markers in sugarcane. **Journal of Sugarcane Research**, v.3, n. 2, p.118-129, 2013.

SHARMA, M. D.; et al. Assessment of genetic diversity among sugarcane cultivars using novel microsatellite markers. **African Journal of Biotechnology**, v.13, n.13, p.1444-1451, 2014.

SHEJI, M.; et al. Analysis of genetic diversity among *Saccharum spontaneum* L. from four geographical regions of India, using molecular markers. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v.53, n.6, p.1221-1231, 2006.

SILVA, D. C.; et al. New Polymorphic EST-SSR Markers in Sugarcane. **Sugar Technology**, v. 14, p.357-363, 2012.

SILVA, J. A. G. Preliminary analysis of microsatellite markers derived from sugarcane expressed sequence tags (ESTs). **Genet Mol Biol**, v.24, p.155-159, 2001.

SILVA, R.R. **Estudo da estrutura populacional em cana-de-açúcar usando marcadores do tipo SNP**. 2013. 88 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Programa de Pós-Graduação, ESALQ/USP, Piracicaba, 2013. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11137/tde-29042013-094035/pt-br.php>.

Acessado em 20/06/2016.

SINGH, R. K.; et al. Evaluation of microsatellite markers for genetic diversity analysis among sugarcane species and commercial hybrids. **AJCS**, v.4, n.2, p.115-124, 2010.

SINGH, R. K.; et al. Identification of new microsatellite DNA markers for sugar and related traits in sugarcane. **Sugar Technology**, v.10, p. 327-333, 2008.

SNEATH, P. H. A.; SOKAL, R. R. **Numerical taxonomy: the principles and practices of numerical classification**. São Francisco: W. H. Freeman & Co., p.573, 1973.

SUMAN, A.; et al. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP) markers for assessing genetic relationships and diversity in sugarcane germplasm collections. **Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization**, v.6, n.3, p.222-231, 2008.

TAI, P. Y. P.; MILLER, J. D. A Core Collection for *Saccharum spontaneum* L. from the World Collection of Sugarcane. **Crop Sci**, v.41, p.879-885, 2001.

TESSIER, C.; DAVID, J.; THIS, P.; BOURSQUOT, J.M.; & CHARRIER. Optimization of the choice of molecular markers for varietal identification in *Vitis vinifera* L. **Theor Appl Genet**, v.98, p.171-177, 1999.

TIVANG, J. G.; NIENHUIS, J.; SMITH, O. S. Estimation of sampling variance o molecular marker data using the bootstrap procedure. **Theoretical and Applied Genetics**, v.89, p.259-264, 1994.

TODD, J.; et al. Phenotypic characterization of the Miami World Collection of sugarcane (*Saccharum* spp.) and related grasses for selecting a representative core. **Genet Resour Crop Evol**, 2014.

UNIÃO DA INDÚSTRIA DA CANA-DE-AÇÚCAR. UNICA (2016). Disponível em: <http://www.unica.com.br/Downloads/estudosmatrizenergetica/pdf/MATRenerget_FINAL_WEB.pdf> Acessado em 12/10/2016.

WANG, Z., et al. Survey of plant short tandem DNA repeats. **Theory Appl Genet**, v.88, p.1-6, 1994.

XAVIER, M. A.; et al. Paternity identification in sugarcane polycrosses by using microsatellite markers. **Genetic and Molecular Research**, v.13, n.1, p.2268-2277, 2014.

ZHANG, M.; et al. Molecular marker application in sugarcane. **Sugar Tech**, v.6, n.4, p.251-259, 2004.