



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ – UESC  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO  
VEGETAL – PPGPV**

**CARLOS ALUGUSTO DIAS KANTHACK JUNIOR**

**DIVERSIDADE GENÉTICA MOLECULAR DE ACESSOS DO  
COMPLEXO *SACCHARUM* CONTRASTANTES PARA TEORES DE  
FIBRA E AÇÚCAR**

**ILHÉUS-BAHIA**

**2018**

**CARLOS ALUGUSTO DIAS KANTHACK JUNIOR**

**DIVERSIDADE GENÉTICA MOLECULAR DE ACESSOS DO  
COMPLEXO *SACCHARUM* CONTRASTANTES PARA TEORES DE  
FIBRA E AÇÚCAR**

Tese apresentada à Universidade Estadual de Santa Cruz, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Produção Vegetal.

Área de concentração: Melhoramento de plantas

Orientador: Dr. Ronan Xavier Corrêa

Co-orientadora: Dra. Luciana Rossini Pinto

**ILHÉUS-BAHIA**

**2018**

**CARLOS ALUGUSTO DIAS KANTHACK JUNIOR**

**DIVERSIDADE GENÉTICA MOLECULAR DE ACESSOS DO  
COMPLEXO *SACCHARUM* CONTRASTANTES PARA TEORES DE  
FIBRA E AÇÚCAR**

Tese apresentada à Universidade Estadual de Santa Cruz, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Produção Vegetal.

Ilhéus, 27 de fevereiro de 2018.

---

Dr. Ronan Xavier Corrêa  
(DCB/UESC-Orientador)

---

Dr, Mauro Alexandre Xavier  
(IAC-Centro de Cana)

---

Dr. Márcio Gilberto Cardoso Costa  
(DCB/UESC)

---

Dr. Dário Ahnert  
(DCB/UESC)

---

Dr. Cláudio Antônio Ferreira Melo  
(DCB/UESC)

*Dedico aos meus avós  
Bodo, Francisca e Euvênia,  
in memoriam.*

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Estadual de Santa Cruz e ao o Programa de Pós Graduação em Produção Vegetal, pela oportunidade de aperfeiçoar meus conhecimentos;

Ao Professor Ronan Xavier Corrêa, pela orientação e ensinamentos;

À Dra. Luciana Rossini Pinto, pelo suporte na execução do trabalho;

À minha esposa Gessilene e a meus filhos Rafael e Fernanda, pelo amor e dedicação no convívio;

Aos meus pais, Carlos e Vani, pela longa e irreversível caminhada até aqui;

À equipe da Biotecnologia do Centro de Cana/IAC em Ribeirão Preto, em especial a João Manechini, Juliana Boges, Taís, Maicon e Marcel, bem como aos técnicos Rodolfo e Oséias;

À equipe da Estação de Híbridação, na pessoa do Sr. João Cassimiro, pelo companheirismo e entusiasmo no dia a dia;

Ao Programa Cana/IAC, que viabilizou a realização deste doutorado.

**Tanto melhor, combateremos à sombra...**

**(Dienekes)**

## EXTRATO

KANTHACK Jr., Carlos Augusto Dias. Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, fevereiro de 2018. **Diversidade genética molecular de acessos do Complexo *Saccharum* contrastantes para teores de fibra e açúcar.** Orientador: Ronan Xavier Corrêa. Co-orientadora: Luciana Rossini Pinto.

O presente estudo objetivou caracterizar a diversidade de 96 genótipos do Complexo *Saccharum*, quanto aos atributos tecnológicos referentes a teores e de fibra e de açúcar, por meio de genes candidatos correspondentes a esses. O estudo da variabilidade genética dos acessos propostos, a determinação dos atributos tecnológicos e a verificação de marcadores moleculares de genes candidatos relacionados aos teores de fibra e açúcar possibilitam a disponibilização de importantes ferramentas para o melhoramento genético de cana. A meta principal deste estudo foi gerar conhecimentos visando melhoramento para o incremento do potencial de utilização bioenergético da cana-de-açúcar. Isso permitirá a utilização racional desses genótipos no melhoramento genético da cultura, em especial Programa Cana-IAC. Para promover essa contribuição ao melhoramento da cana-de-açúcar foram utilizados conjuntos de genes candidatos através de marcadores de polimorfismo de amplificação da região-alvo (TRAP) para biossíntese de lignina/fibra e, para o metabolismo da sacarose/açúcar, foram utilizados para estimar a similaridade e a variabilidade genética de 96 genótipos pertencentes ao Complexo *Saccharum*, identificados previamente quanto a sua origem (acessos, cultivares tradicionais e cultivares modernas). Os genes candidatos para fibra revelaram uma quantidade de 3 subpopulações (K=3) com conteúdo de informação de polimorfismo (PIC) médio de 0,30 com o maior valor sendo obtido pelo gene candidato F5H (0,323), além de auferir um coeficiente de similaridade (Jaccard) máximo de 0,38, para a subpopulação de cultivares tradicionais. Os resultados obtidos pelo conjunto de genes candidatos para açúcar demonstraram uma distribuição dos genótipos estudados em 2 subpopulações (K=2) com PIC médio atingindo 0,32, sendo o gene que evidenciou maior polimorfismo o SUT4 (PIC=0,376) e os genótipos identificados como cultivares modernas apresentaram o maior coeficiente de similaridade (0,38).

**Palavras Chave:** Cana-de-açúcar, Diversidade, Gene Candidato, TRAP, Melhoramento.

## ABSTRACT

KANTHACK Jr., Carlos Augusto Dias. State University of Santa Cruz, Ilhéus, February 2018. **Molecular genetic diversity of accessions of the *Saccharum* Complex, contrasting for fiber and sugar contents.** Advisor: Ronan Xavier Corrêa. Co-Advisor: Luciana Rossini Pinto

The present study aimed to characterize the diversity of 96 genotypes of the *Saccharum* Complex regarding the technological attributes related to fiber and sugar contents, through candidate genes corresponding to them. The study of the genetic variability of the proposed accessions, a determination of the technological attributes and a selection of molecular markers of genes, that can be applied for the genetic improvement of cane. A main goal of this study was to generate knowledge aiming at improving the potential of bioenergetic use of sugarcane. This is a rational use, it is not genetic improvement of the crop, especially Cana-IAC Program. To promote the contribution to sugarcane breeding for the use of candidate gene product sets through target region amplification polymorphism (TRAP) markers for lignin / fiber biosynthesis and for the metabolism of sucrose / sugar for use to estimate a similarity and genetic variability of 96 genotypes belonging to the *Saccharum* Complex, previously identified as their origin (accessions, traditional cultivars and modern cultivars). The candidate fiber genes revealed an amount of 3 subpopulations ( $K = 3$ ) with a mean polymorphic information content (PIC) of 0.30 with the highest value being obtained by the candidate gene F5H (0,323) besides obtaining a similarity coefficient (Jaccard) maximum of 0.38, for a subpopulation of traditional cultivars. The results obtained by the set of candidate genes for sugar showed a distribution of the genotypes studied in 2 subpopulations ( $K = 2$ ) with mean ICP acquiring 0.32, the gene that showed the highest polymorphism was SUT4 (PIC = 0.376) and the genotypes identified as modern cultivars presented the highest coefficient of similarity (0.38).

**Keywords:** Sugar cane, Diversity, Candidate Gene, TRAP, Breeding.



## INDICE

EXTRATO.....	6
ABSTRACT.....	7
INTRODUÇÃO.....	10
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
A planta <i>cana-de-açúcar</i> : taxonomia e descrição.....	16
Histórico da cana: das origens aos programas de melhoramento.....	17
Uso de Marcadores Moleculares no Melhoramento de Cana-de-Açúcar.....	22
A técnica TRAP ( <i>Target Region Amplified Polimorphism</i> ).....	30
Marcadores TRAP Relacionados a Genes Candidatos para Metabolismo de Sacarose e para Biossíntese de Lignina.....	36
CONSIDERAÇÕES SOBRE A REVISÃO.....	38
GENETIC DIVERSITY OF SUGARCANE ACCESSIONS VIA TRAP MARKERS OF CANDIDATE GENES RELATED TO LIGNIN BIOSYNTHESIS AND SUCROSE METABOLISM.....	39
ABSTRACT.....	39
INTRODUCTION.....	40
MATERIAL AND METHODS.....	42
Samples and DNA extraction.....	42
Target Region Amplification Polymorphism.....	42
Genotyping and establishment of molecular profiles in the DNA Analyzer.....	43
Data analysis.....	43
RESULTS AND DISCUSSION.....	44
Polymorphism analysis of the candidate genes involved in the metabolism of fiber (lignin) and sugar (sucrose).....	44
Genetic structure analysis.....	46

Genetic similarity and clustering analysis for candidate genes.....	48
CONCLUSIONS.....	49
REFERENCES.....	50
FIGURE LEGENDS.....	52
TABLES.....	57
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	62
REFERÊNCIAS.....	64
ANEXOS.....	70

## INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar é uma cultura de extrema importância no cenário mundial, destacando-se o Brasil como principal país produtor, seguido respectivamente por Índia e China. Além de ser líder na exportação de açúcar, o Brasil é referência no setor sucroenergético, que gera uma renda superior a US\$ 7 bilhões. A cana-de-açúcar é a base para todo o setor, representado por mais de 400 indústrias de açúcar e álcool e 1.000.000 empregos diretos e indiretos. Cerca de 9% da área agrícola do Brasil é utilizada pela cana-de-açúcar, sendo que o estado de São Paulo aparece como o maior produtor, utilizando 54% da área total cultivada no país, seguido por Minas Gerais com 8,0%, Goiás com 7,5%, Paraná com 7,2%, Alagoas com 5,5%, Mato Grosso do Sul com 5,0% e Pernambuco com 4,2% (PORTAL BRASIL, 2017; CONAB, 2017).

A produção de cana-de-açúcar, estimada para a safra 2017/18, é de 646,4 milhões de toneladas. Uma redução de 1,7% em relação à safra anterior. A área a ser colhida está estimada em 8,77 milhões de hectares, queda de 3,1%, se comparada com a safra 2016/17. A produção de açúcar deverá atingir 39,39 milhões de toneladas, um aumento de 1,8% ao produzido na safra 2016/17 (PORTAL BRASIL, 2017; CONAB, 2017).

A produção de etanol, para 2017/18, deverá ser de 26,12 bilhões de litros, redução de apenas 6,1% em razão da preferência pela produção de açúcar. O etanol anidro, utilizado na mistura com a gasolina, deverá ter aumento de 0,2% na sua produção, alcançando 11,1 bilhões de litros, influenciada pela manutenção do consumo de gasolina em detrimento ao etanol hidratado, que, em 2016/2017, teve redução de 10,2% ou 1,71 bilhão de litros (PORTAL BRASIL, 2017; CONAB, 2017).

Além do açúcar e do etanol, a cana é utilizada, também, na alimentação animal, como forragem, como matéria prima para a fabricação de rapadura, melado e aguardente. Seus resíduos também têm grande importância econômica, por exemplo, o vinhoto é transformado em adubo e a queima do bagaço gera energia elétrica (CARLINI-GARCIA et al, 2012).

Para se chegar a essa produção e a esses produtos, inúmeras variedades de cana-de-açúcar foram desenvolvidas ao longo do tempo. De

acordo com Dinardo-Miranda; Vasconcelos e Landell (2008), as variedades de cana-de-açúcar que hoje conhecemos são, na realidade, híbridos interespecíficos do gênero *Saccharum*, da família *Poaceae*, antes classificada como *Gramineae*. Como espécies pertencentes ao gênero *Saccharum*, estão: *S. officinarum* L., *S. spontaneum* L., *S. robustum* J., *S. sinnensis* R., *S. barberi* J, cada uma podendo contribuir com uma característica agrônômica importante na formação de novos híbridos comerciais de alta performance agroenergética. Por exemplo, alto teor de sacarose, que proveio basicamente da *S. officinarum*; as características de perfilhamento e capacidade de brotação de soca se originam em *S. spontaneum*. Além do gênero *Saccharum*, podem participar, de cruzamentos intergenéricos e, portanto, produzirem variedades híbridas, os gêneros *Erianthus*, *Miscanthus*, *Narenga* e *Sclerostachya*.

Os aumentos do teor de sacarose e de produtividade, considerando-se diferentes ambientes produtivos e porte ereto, visando colheita mecanizada, foram quesitos bastante perseguidos por programas de melhoramento no Brasil, durante a última metade do século 20, no intuito de obter novas variedades de cana. Mais recentemente, com o advento de tecnologias que propiciam novos aproveitamentos da cana, como a produção de etanol de segunda geração, a partir do conteúdo fibroso da cana e a produção de bioenergia, pelo aproveitamento de bagaço, os referidos programas de melhoramento têm se empenhado para a obtenção de variedades de cana, que, por escaparem do conceito de aproveitamento tradicional da cana-de-açúcar, estão sendo denominadas de cana biomassa.

O sucesso de um programa de melhoramento genético está condicionado à utilização e ao manejo corretos dos recursos genéticos ao longo dos ciclos seletivos (RESENDE, 2002). O Instituto Agrônômico de Campinas (IAC) foi responsável pela introdução e pela avaliação de diversos cultivares no período de 1935 a 1975, contribuindo no seu tempo como base para a grande canavicultura comercial que haveria de se estabelecer, posteriormente, no Brasil.

Os programas de melhoramento genético de cana, existentes em dezenas de países, são responsáveis por essa mudança essencial, usando, para tanto, estratégias de hibridação e seleção diferenciadas. São eles que, atentos às novas demandas, lançam novas variedades no intuito de construir

os cenários de médio e longo prazo, sendo que um dos principais processos de melhoramento de cana é a obtenção de variedades por meio de hibridação controlada e posterior seleção da progênie (DINARDO-MIRANDA; VASCONCELOS; LANDELL (2008).

A realização de seleção de diversas famílias, em diferentes locais, possibilita o aparecimento de indivíduos de grande adaptabilidade a ambientes específicos de produção. Nesse processo, a hibridação é responsável pela evolução da produtividade nacional obtida nos últimos vinte e cinco anos, através de trabalhos desenvolvidos nos diversos Programas de Melhoramento, destacadamente pelo CTC (Centro de Tecnologia Canavieira), RIDESA (Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroalcooleiro) e, mais recentemente, pelo PROGRAMA CANA/IAC, os quais usaram esse procedimento para obtenção de suas respectivas variedades (LANDELL; PINTO, 2009).

Na obtenção de variedades destinadas à produção de etanol de segunda geração e bioenergia (variedades tipo biomassa), os teores de fibra e a composição da mesma assumem relevância na seleção de novos clones. De acordo com Ogata (2013), a agroindústria sucroenergética origina uma grande quantidade de subprodutos com elevados teores de fibra, como o bagaço e a palha. Vários estudos têm sido conduzidos no intuito de utilizar esses subprodutos como matéria-prima para a obtenção de etanol celulósico, energia e diversos compostos de interesse industrial.

As biomassas lignocelulósicas, como o bagaço da cana, são compostas principalmente de celulose, hemicelulose e lignina, sendo que a proporção de cada componente é dependente de diversos fatores. No caso da cana, há variedades que apresentam diferentes teores de fibra; por isso, conhecer a sua composição (principalmente, celulose, hemicelulose e lignina) é importante para a utilização de material residual na geração de produtos de maior valor agregado.

A celulose é um polímero de glicose, rígido e muito resistente à hidrólise; hemicelulose é um polímero de baixa massa molecular e mais susceptível à hidrólise quando comparada à celulose, uma vez que apresenta menor grau de polimerização; e a lignina é uma substância hidrofóbica, com estrutura tridimensional e amorfa. São muitos os compostos de interesse nas biomassas

lignocelulósicas de cana, sendo obtidos produtos de elevado valor agregado e energia por rotas bioquímicas ou termoquímicas e de maneira sustentável a serem utilizadas em biorrefinarias (OGATA, 2013).

Conforme Vencovsky e Barriga (1992), o sucesso do melhoramento está diretamente relacionado à qualidade/variabilidade do Banco Ativo de Germoplasma (BAG) existente em cada Programa. Isso posto, impera a necessidade de as coleções receberem frequentemente introduções de diversas origens, bem como terem estabelecidas estratégias para incorporação de indivíduos, que tenham se destacados no processo de seleção, mesmo que não tenham sido lançados no Programa como variedade comercial. Isso permite alterar a média populacional dos caracteres no sentido de adquirir uma melhor adequação aos interesses agrícolas. A herdabilidade dos caracteres de maior importância econômica assume grande importância na eficácia do processo seletivo.

Várias pesquisas destacam a estreita base comum na árvore genealógica dos principais programas de melhoramento de cana no mundo (TAI; MILLER, 2001; POMMER; BASTOS, 1984; PIRES, 1993). Esse estreitamento da base genética promove sérias restrições relacionadas à endogamia, o que afeta a variabilidade genética das populações. Na cana-de-açúcar, o genótipo de cada planta pode ser transmitido integralmente através das gerações e multiplicado via clonagem através dos colmos (BRESSIANI, 2001).

Isso implica que, após a hibridação, uma variedade de cana estaria disponível na população na primeira fase de seleção (geração F1). No entanto, a falta de instrumentos auxiliares de discernimentos eficientes, para a definição de uma nova variedade logo após a hibridação, faz com que o processo de obtenção da referida nova variedade seja longo, normalmente atingido de 10 a 15 anos de avaliações contínuas (DINARDO-MIRANDA; VASCONCELOS; LANDELL (2008). Durante esse período, a área experimental é ampliada e as repetições são realizadas em diferentes condições edafoclimáticas e distintos anos.

De acordo com Landell e Pinto (2009), a biotecnologia aparece como uma ferramenta valiosa para os programas de melhoramento genético, principalmente por oferecer a possibilidade de reduzir o tempo gasto na

produção de novas variedades com características agronômicas desejáveis. A utilização dessa ferramenta no melhoramento genético de cana-de-açúcar, embora relativamente recente, já proporcionou que alguns progressos fossem obtidos e vislumbra, ainda, muitas possibilidades de utilização.

A propósito, o uso de marcadores moleculares em estudos de diversidade genética e caracterização de germoplasma é de fundamental importância para orientar estratégias de ampliação da base genética das variedades de cana-de-açúcar. Esses marcadores também apresentam o potencial de diferenciar os clones individuais de forma segura e precisa, proporcionando perfis únicos de DNA, isto é, uma “impressão digital” (*fingerprinting*) para cada clone de interesse. Esse tipo de análise é essencial quando se deseja proteger legalmente uma nova variedade, garantindo ao melhorista a sua propriedade intelectual e, conseqüentemente, o retorno do investimento financeiro à Instituição de Pesquisa envolvida no desenvolvimento da nova variedade (LANDELL; PINTO (2009).

A construção de mapas de ligação, que permitam a localização de regiões genômicas de efeito significativo na expressão de características agronômicas importantes, é outra aplicação do uso de marcadores moleculares no melhoramento genético de cana-de-açúcar. Outra possibilidade é a utilização de marcadores genéticos fortemente ligados a teores de fibra e seus componentes, como a lignina, o que pode auxiliar na identificação de plantas adequadas à produção de etanol de segunda geração e ao aproveitamento bioenergético, já nas fases iniciais de seleção.

Uma das técnicas promissoras utilizadas para esses fins é conhecida como TRAP (*Target Region Amplification Polymorphism*), desenvolvida por Hu e Vick (2003). Trata-se uma técnica que utiliza um marcador dominante que combina a facilidade dos marcadores RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) sendo, porém, altamente reproduzível, com abundante polimorfismo dos marcadores AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*). A metodologia TRAP utiliza ferramentas de bioinformática e ESTs (*Expressed Sequence Tags*) para detectar marcadores polimórficos ao redor de sequências de genes candidatos. Isso ocorre através da combinação de um *primer* fixo, desenhado a partir de uma sequência EST de interesse e um *primer* arbitrário. Trabalhos recentes relatam o emprego de marcadores TRAP no acesso da diversidade

genética em cana e a identificação de possíveis genes candidatos associados à tolerância ao frio e envolvidos na rota metabólica da sacarose (ALWALA et al., 2006).

Tendo em vista a importância de se desenvolver novas tecnologias para contribuir com o melhoramento de cana, o presente trabalho teve como objetivo caracterizar diferentes genótipos compostos principalmente por acessos de *S. spontaneum*, *S. officinarum* e cultivares comerciais quanto à sua diversidade genética com base em marcadores TRAP de genes candidatos envolvidos no metabolismo de sacarose (açúcar) e na biossíntese de lignina (fibra).



## REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### A planta *cana-de-açúcar*: taxonomia e descrição

Conforme Cronquist (1981), a cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) tem a seguinte classificação taxonômica: pertence ao gênero *Saccharum*, tribo *Andropogonae*, família *Poaceae*, ordem *Cyperales*, classe *Liliopsida*, divisão *Magnoliophyta*, reino *Plantae*. O Complexo Cana ou ainda Complexo *Saccharum*, de acordo com estudo da biologia e ecologia da cana-de-açúcar realizado pelo Australian Government (2004) e por Cheavegatti-Gianotto et al. (2011), é composto por:

1. *S. officinarum*: essa espécie, conhecida pela sua capacidade de acúmulo de açúcar, tem o número de cromossomos de  $2n = 80$  com um número de cromossomo básico ( $x$ ) de 10, tornando essa espécie um poliploide (tendo mais de dois conjuntos de cromossomos, por exemplo, octaploide, oito conjuntos completos de cromossomo). No entanto, a espécie não é um simples poliploide, é um híbrido complexo de diferentes espécies, bem como um autopoliploide (mais de dois conjuntos de cromossomos homólogos derivados de uma única espécie).
2. *S. spontaneum*: trata-se de uma espécie menor, altamente polimórfica, resistente a doenças, de alta fibra e altamente vigoroso, com  $2n = 40 - 128$  cromossomos. É também um poliploide complexo com um provável número de cromossomos básicos entre 8 e 10.
3. *S. barberi* e *S. sinense*: são consideradas espécies selvagens, mas têm sido cultivadas desde os tempos pré-históricos no norte da Índia e na China, respectivamente. Isso levou a uma quantidade considerável de intercruzamento com outros gêneros e espécies e, conseqüentemente, elas passaram a ser consideradas importantes híbridos intergenéricos. Acredita-se que *S. barberi* é o produto da introgressão de *S. officinarum* x *Erianthus*, enquanto que *S. sinense*

é proveniente de *S. officinarum* x *Miscanthus*, cada um contendo cromossomos homólogos a *S. officinarum* e *S. spontaneum*, bem como dos gêneros *Erianthus* e *Miscnathus*, novamente indicando as origens complexas e inter-relações dentro do gênero *Saccharum*.

4. *S. robustum*: é uma espécie selvagem que se encontra em um estágio intermediário na evolução entre *S. spontaneum* e *S. officinarum*. Seu número de cromossomos varia  $2n = 60$  a  $80$ .
5. *S. edule*: é morfologicamente similar à *S. robustum*, com a diferença que as panículas permanecem fechadas, sendo inclusive consumidas como um vegetal nas ilhas do Pacífico.
6. Os gêneros *Erianthus*, *Miscanthus*, *Sclerostachya* e *Narenga*, em função de certa proximidade evolucionária, também estão associados ao Complexo *Saccharum*/Cana.

Conforme Alwala e Kimbeng (2010), consideram-se as cultivares atuais de cana um organismo aneupoliploide, altamente heterozigótico, oriundas principalmente de cruzamentos entre *S. officinarum* e *S. spontaneum*, e posteriores retrocruzamentos com parental apresentando característica de interesse, o que na maior parte se resume à utilização de *S. officinarum*, objetivando a elevação dos teores de açúcar. Esse processo ficou conhecido como nobilização e as cultivares resultantes como canas nobres. D'Hont et al. (1996) afirmam que 80% do genoma das variedades modernas de cana são oriundos de *S. officinarum*, 10% de *S. spontaneum* e os 10% remanescentes vêm da recombinação entre eles.

### **Histórico da cana: das origens aos programas de melhoramento**

A cana-de-açúcar é uma planta perene, de propagação comercial vegetativa e de ocorrência natural em áreas de clima tropical e subtropical. Embora haja divergência entre os estudiosos quanto ao local exato de sua origem, consideram-se as ilhas polinésias, Nova Guiné e Índia, no sudeste

asiático, locais onde ela foi inicialmente explorada, cerca de 8000 anos passados da era atual (FIGUEIREDO, 2008). De acordo com Daniels e Roach (1987), centros de diversidades são identificados na Nova Guiné (*S. officinarum* e *S. robustum*), norte da Índia (*S. barberi*) e China (*S. chinense*).

Grivet et al.(2004) demonstram, através da revisão de diversas análises de dados com base em genética molecular, que há poucas dúvidas de que a cana-de-açúcar surgiu dentro de uma linhagem específica de *Saccharum* (*S. officinarum* originou-se a partir de hibridação natural de *S. robustum*), independente das linhagens de *Erianthus* e *Miscanthus* e que o cenário estabelecido por Brandes, ainda em 1958, para explicar a origem das cultivares tradicionais é bastante correto (processo de nobilitação, com uso principalmente de *S. spontaneum* e posterior uso da técnica de retrocruzamento). Afirmam que, embora as amostras às vezes tenham sido pequenas em estudos, é improvável que um estudo ampliado modifique dramaticamente o cenário por eles apresentados. Concluem ainda que técnicas moleculares robustas estão bem estabelecidas, sendo que, na atualidade, o fator limitante para a compreensão abrangente da domesticação da cana-de-açúcar é o acesso à germoplasma relevante.

O desenvolvimento da extração do açúcar e sua utilização fizeram com que o cultivo da cana se expandisse a partir do Golfo de Bengala, para a antiga China, Pérsia, Egito e Arábia, de onde se difundiu rapidamente pela Costa Mediterrânea. A introdução da cana-de-açúcar no continente americano se deu, primeiramente, na segunda expedição de Cristóvão Colombo, em 1493, tendo ocorrida a implementação da cultura no Haiti. De acordo com o levantamento feito por Figueiredo (2008), essa primeira introdução se perdeu, só ocorrendo nova introdução na América Espanhola em 1509 na Ilha de São Domingos.

Segundo Machado (2000), durante o período colonial, o cultivo da cana se estendeu às demais regiões tropicais e subtropicais do mundo. No Brasil, as primeiras mudas, provenientes da Ilha da Madeira, foram introduzidas em 1532, na Capitania de São Vicente, por Martim Afonso de Souza. Era o princípio da indústria açucareira que, por ter encontrado no Brasil solos férteis e condições climáticas favoráveis, expandiu-se rapidamente, resultando, a

princípio, no monopólio mundial da produção de açúcar já na década de 1580 (FIGUEIREDO, 2008).

A primeira variedade cultivada no Brasil foi a denominada Creola, Criola ou Mirim, identificada como uma *S. officinarum*. Depois, a partir do século XVIII, foi introduzida a Caiana (*S. officinarum*), extremamente utilizada até o final dos anos 1880. Nessa época, o aparecimento de problemas fitossanitários, a exemplo da Gomose no Brasil e do Mal de Sereh na Indonésia, que causaram grandes prejuízos ao setor, motivou a busca por cultivares resistentes, o que resultou nos estudos da inflorescência, na obtenção de sementes férteis de cana e no desenvolvimento do processo de hibridação como ferramenta para cultivares mais resistentes e produtivas em países como Barbados, Indonésia (Java) e, posteriormente, no Brasil. Nascia, assim, o Melhoramento Genético da cana-de-açúcar, nos moldes como é conhecido atualmente (FIGUEIREDO, 2008).

Muitos materiais oriundos de programas de melhoramento foram introduzidos no Brasil no início do século XX, objetivando a superação dos prejuízos causados pelas doenças emergentes à época, como as cultivares javanêsas (POJ 213, POJ 2878, POJ 2714, entre outras), indianas (Co413, Co419, Co740, etc...) e americanas (CP29-320, CP34-320, CP227-139 e CP28-19). As primeiras tentativas de hibridação no Brasil foram realizadas em 1901 em Pernambuco, sendo que o melhoramento de cana-de-açúcar teve início no Instituto Agrônomo de Campinas nos anos 1930, o qual perdura até os dias de hoje, de forma a ser o programa de melhoramento de cana-de-açúcar mais longo do país (FIGUEIREDO, 2008).

A realização de cruzamentos, utilizando-se das cultivares nobilizadas a partir da década de 1930, produziu, ao redor do mundo, novas cultivares comerciais, as quais foram muito importantes para atividade nas três décadas seguintes, sendo amplamente utilizadas em programas de melhoramento. Na atualidade, cultivares que foram obtidas por cruzamentos, entre clones em fases avançadas de seleção ou entre cultivares comerciais, têm predominado nos sensois varietais (LANDELL; BRESSIANI, 2008).

Landell e Bressiani (2008) esclarecem que o melhoramento da cana-de-açúcar, a exemplo de outras plantas cultivadas, teve início com a domesticação e mais especificamente na seleção por parte das populações humanas nas

regiões de origem dessa planta, à época, em função de maiores teores de açúcar. No caso da *S. officinarum*, a origem proposta mais aceita pelos melhoristas é a de hibridação natural de espécies de *S. robustum* na Nova Guiné; no caso da *S. sinense* e *S. barberi*, foram constituídas a partir também da hibridação natural entre *S. officinarum* e *S. spontaneum*. As cultivares de *S. officinarum* se espalharam rapidamente pelo mundo e, atualmente, constituem a base genética da cultura, enquanto *S. sinense* e *S. barberi* são encontradas apenas nos bancos de germoplasma.

De acordo com Ming et al. (2006), após o advento da hibridação artificial, e, conseqüentemente, o melhoramento de cana-de-açúcar, cinco períodos foram constituídos, a saber: 1: cruzamento entre *S. officinarum* (canas nobres); 2: processo denominado de “nobilização”, o qual consistia no cruzamento de *S. officinarum* e *S. spontaneum* e no retrocruzamento com a primeira espécie; 3: cruzamento entre cultivares nobilizadas, gerando cultivares híbridas; 4: cruzamento entre clones híbridos, que resultaram nas cultivares atuais; e 5: cruzamentos com a finalidade de ampliar a base genética.

Grivet et al. (2004) sustentam que os recursos passíveis de utilização no melhoramento da cana-de-açúcar devem ser elencados em três grupos: 1) cultivares tradicionais, que são genótipos comumente utilizados como genitores das canas modernas e que são originários do processo de domesticação, também conhecidas como canas nobres (*S. officinarum*); 2) acessos selvagens, que incluem principalmente genótipos de *S. spontaneum*, *S. robustum* e espécies dos demais gêneros do Complexo *Saccharum*; 3) cultivares modernas, obtidas pela hibridação interespecífica, principalmente entre *S. officinarum* e *S. spontaneum*.

No que diz respeito à diversidade genética, Shrivastava e Shrivastava (2016) desenvolveram uma análise da mesma para ganhos agrônômicos no gênero *Saccharum* e demais correlatos ao Complexo Cana, no intuito de poder incrementar a produção, não apenas de açúcar, mas também de etanol de segunda geração, energia e outras formas de utilização da cana-de-açúcar. Com a análise, os autores concluíram que a biodiversidade da cultura da cana-de-açúcar não se encontra somente na natureza, mas também nos programas de melhoramento. A incorporação de características desejáveis por meio do melhoramento, notadamente o incremento dos teores de açúcar, através de um

número reduzido de genótipos, resultou no estreitamento da base genética e contribuiu para o arrefecimento do ritmo dos ganhos genéticos da cana-de-açúcar.

Landell e Bressiani (2008), em consonância com Roach (1989)<sup>1</sup>, afirmam ser relevante envidar esforços para se ampliar a base genética da cana-de-açúcar, o que vem da constatação que boa parte das cultivares atuais é derivada de menos de 20 genótipos, todos obtidos pelo processo de nobilitação nos programas de melhoramento Indonésio e indiano. Também concordam com Walker (1987)<sup>2</sup>, que afirma ser a base genética das populações melhoradas atuais aparentemente inferior à existente nos primórdios do melhoramento, muito em função da seleção direcionada, em especial dos teores de açúcar, por mais de cem anos.

Shrivastava e Shrivastava (2016) sugerem que a diversidade genética (polimorfismo) seja investigada tanto dentro do gênero *Saccharum* (*S. spontaneum* principalmente) quanto nos gêneros *Erianthus*, *Narenga*, *Sclerostachya*, etc. Citam como exemplo a nova geração de clones de híbridos interespecíficos com a promissora incorporação de genes de *Erianthus sp.*, que vem ocorrendo em diversos programas de melhoramento, assim como a identificação de genes candidatos ligados a características agrônomicas desejáveis e à tolerância a diferentes estresses bióticos e abióticos, abrindo caminhos a genótipos elites de cana-de-açúcar.

O grande impacto da biotecnologia no melhoramento da cana-de-açúcar advém, certamente, do desenvolvimento de variedades transformadas. A busca contínua por estratégias de controle de doenças na produção agrícola, melhorias e inovações nos processos industriais, bem como a necessidade crescente de uma agricultura sustentável têm despertado grande interesse na tecnologia de organismos geneticamente melhorados, uma ferramenta moderna para a incorporação de características de interesse na cana-de-açúcar. Dessa forma, genes conferindo resistência a pragas e doenças, tolerância a herbicidas, ao alumínio e à seca, bem como maiores porcentuais

---

<sup>1</sup> ROACH, B. T. Origin and improvement of the genetic base of sugarcane. **Proceedings of Australian Society of Sugar cane Technology**, v. 11, p. 34-47, 1989.

<sup>2</sup> WALKER, D. I. T. Manipulating the genetic base of sugarcane. In: COPERSUCAR INTERNATIONAL BREEDING WOKSHOP. Piracicaba, p. 321-334, 1987.

de fibra poderão ser diretamente inseridos em materiais elites, garantindo o potencial produtivo desses materiais (LANDELL; PINTO, 2009).

### **Uso de Marcadores Moleculares no Melhoramento de Cana-de-Açúcar**

Creste et al. (2008) destacam que os programas de melhoramento genético de cana-de-açúcar conheceram grande desenvolvimento valendo-se do procedimento da hibridação e seleção de genótipos superiores, principalmente da utilização de parentais *S. officinarum* ( $2n=80$ ) e *S. spontaneum* ( $2n=40-128$ ), uma técnica que possibilitou transmissões assimétricas de cromossomos, resultando nas cultivares modernas de elevado número de cromossomos ( $2n= 100-130$ ). O procedimento em questão proporcionou cultivares altamente produtivas, mais que dobrando o potencial produtivo, mas limitando o melhoramento em função do elevado nível de ploidia, da ocorrência de aneuploidia e da complexidade citogenética dos híbridos interespecíficos.

Nesse contexto de desafios para o melhoramento genético convencional, cuja seleção fenotípica em populações segregantes dura de 10 a 15 anos, a utilização de marcadores moleculares aparece como valiosa ferramenta para encurtar e baratear o processo de melhoramento genético da cana-de-açúcar, a exemplo da utilização como *fingerprints* e nas estimativas de distância genética (SHARMA et al., 2014).

Por ser a cana-de-açúcar um organismo aneupoliploide, seu mapeamento genético é dificultado em função de esse organismo possuir vários alelos ligados a um mesmo loco, podendo os mesmos se apresentarem numa ou em múltiplas cópias (marcadores dose única/dose múltipla), ocorrendo, ainda, diversos grupos de homologia com número irregular de cromossomos.

Wu et al. (1992<sup>3</sup>, apud CRESTE et al., 2008), para viabilizar o mapeamento genético em poliploides, propuseram um método em que os indivíduos são genotipados com base na presença ou ausência de bandas,

---

<sup>3</sup> WU, K. K. et al. The detection and estimation of linkage in polyploids using single-dose restriction fragments. *Theoretical Applied Genetic*, Berlin, v. 83, n. 3, p. 294-300, jan. 1992.

sem depender do tipo de marcador usado. Marcadores em dose única (MDU) podem ser verificados na segregação em proporção de 1:1 (presença: ausência), quando o marcador em questão está presente em um dos genitores apenas. Quando ambos os genitores possuem o referido MDU, a segregação segue a proporção 3:1, como ilustra o seguinte exemplo:

Seja P1, possuidor de uma banda que está ausente em P2, do cruzamento entre esses dois cruzamentos, subentende-se que o alelo “presença da banda” possa ser denominado de A e o alelo “ausência de banda” possa ser denominado de a, sendo a presente nesse mesmo loco para os demais genomas que integram esse poliploide, dando origem a uma segregação 1:1, na progênie oriunda desse cruzamento. Por raciocínio análogo, a segregação 3:1 seria observada no cruzamento entre dois genitores que possuem uma determinada banda presente em ambos os genitores, desde que essa banda esteja sendo amplificada a partir de apenas um dos x cromossomos que compõem o poliploide.

Diversos marcadores têm sido utilizados para acessar a diversidade genética da cana-de-açúcar. Brown et al. (2007), por exemplo, utilizaram 15 marcadores microssatélites (SSR) para estudar as relações inter e intra específica, através da análise de 30 clones de cada uma das cinco espécies do gênero *Saccharum* (*S. officinarum*, *S. spontaneum*, *S. barberi*, *S. robustum* e *S. sinense*), além de 6 cultivares comerciais, valendo-se de dois diferentes métodos de estatística multivariada. Os autores, de posse dos resultados, afirmaram que *S. barberi* e *S. sinense* têm suas origens não muito claras, mas que provavelmente descenderam de cruzamentos interespecíficos entre *S. officinarum* e *S. spontaneum*, apesar de estarem mais distantes do *pool* genético encontrado nos bancos de germoplasma, conforme sugerido anteriormente a partir de estudos moleculares.

Nesse mesmo estudo, Brown et al. (2007) corrobora a hipótese de que *S. robustum* deva ser ancestral a *S. officinarum* e que o cruzamento desta última espécie com genótipos de *S. spontaneum* resultou na composição das cultivares atuais. No ano anterior, Edmé et al. (2006) também estudaram o cruzamento de *S. officinarum* (Green German) e *S. spontaneum* (IND 81-146) e avaliaram a segregação genética por meio da utilização de marcadores microssatélites. Apesar de obterem mapas incompletos, entenderam que esses



instrumentos foram bastante informativos em relação à distorção, fusão cromossômica, rearranjos e translocação, observados nos genomas de ambos os parentais.

Dentre as técnicas utilizadas na avaliação de acessos das espécies de cana-de-açúcar, está a RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), que tem permitido aos investigadores fazerem importantes constatações sobre as características genéticas da cultura. Por exemplo, Lu et al. (1994a), ao avaliarem 50 acessos de cana, observaram que as espécies *S. spontaneum*, *S. robustum* e *S. officinarum* formaram três grupos distintos, corroborando a classificação taxonômica clássica. Também, num outro trabalho, Lu et al. (1994b), utilizando o mesmo tipo de marcador, avaliaram a diversidade genética de 40 variedades cultivadas de cana-de-açúcar e constataram que as variedades comerciais se relacionavam, de forma muito próxima, aos clones de *S. officinarum*, e que a diversidade varietal estaria relacionada aos genes de *S. spontaneum*. Com os resultados, os autores sugerem o uso de populações constituídas por variedades modernas em estudos de associação entre caracteres agrônômicos e marcadores moleculares.

A propósito da constatação de que *S. spontaneum* é uma espécie que apresenta elevada variabilidade genética, Besse et al. (1997) também confirmaram isso quando analisaram acessos referentes a espécies do gênero *Erianthus* e do gênero *Saccharum*, também utilizando marcadores RFLPs. Nessa investigação, os autores observaram que o *E. arundinaceus*, originário da Indonésia, diferenciou-se do *E. arundinaceus* e *E. procerus*, originários da Índia.

Num outro trabalho, Besse et al. (1998), agora utilizando marcadores AFLPs, investigaram a diversidade genética dentro e entre os gêneros *Saccharum*, *Erianthus sect. Ripidium*, com espécies originárias do Velho Mundo e *E. giganteum*, espécie nativa da América do Norte. Constataram, a partir das estimativas de similaridade genética, três grandes grupos: i) grupo com espécies do gênero *Saccharum*, formando 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, revelando que a estrutura genética dessa variedade correspondeu aos citótipos encontrados na espécie americana.

Também empregando marcadores RFLP, Jannoo et al. (1999) estudaram 162 clones de cana-de-açúcar, sendo 109 cultivares modernas (híbridos interespecíficos) e 53 acessos de *S. officinarum*. Notaram que entre os clones de *S. officinarum*, oriundos da Nova Guiné, havia maior diversidade, corroborando a hipótese de que tal local possa ser o centro de origem dessa espécie. Quanto aos clones da Nova Caledônia, observaram que eles formaram um outro grupo, representado por acessos que podem ter recebido introgressões oriundas de espécies presentes no complexo *Saccharum*. As cultivares modernas foram subdivididas em dois grupos principais: um com genótipos originários de Barbados, que não apresentam alelos de *S. spontaneum*; e outro com acessos de *Mauritius*, que apresentam alelos de tal espécie.

Outra técnica utilizada na investigação de acessos de cana-de-açúcar é a de RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*). Autores como Chen et al. (2001), Fan et al. (2001) e Nair et al. (2002) são alguns dos que já fizeram uso dessa técnica.

Chen et al. (2001) utilizaram-na para estudar a diversidade genética de 195 acessos de *S. spontaneum* provenientes de várias regiões geográficas da China, confirmando que a província de Yunnan seja o centro de origem dessa espécie. Fan et al. (2001), também estudando essa mesma espécie, verificaram 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 eco-tipos diferentes e a árvore filogenética demonstrou associação com a distribuição geográfica da espécie, com a indicação de que, em Yunnan, a espécie tenha-se originado no sul e, posteriormente, dispersado para lugares mais elevados e com maiores latitudes, no noroeste e nordeste da região.

Nair et al. (2002), ao analisarem 28 importantes variedades indianas de cana, constataram similaridade genômica entre elas. Em função da limitada diversidade genética observada, decorrente do número reduzido de genitores que deram origem ao quadro 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), que, utilizando de marcadores AFLPs, 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*).

Tendo por base 1121 AFLPs polimórficos, Lima et al. (2002) observaram que as estimativas de similaridade genética variaram de 0,28 a 0,89, com média de 0,47, enquanto as estimativas 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, considerada altamente significativa. O dendrograma produzido a partir das estimativas de similaridade entre os acessos gerou vários subgrupos e indicou importante relação entre as cultivares estudadas. Posteriormente, parte desses acessos foi analisado por meio de outros tipos de marcadores, o que resultou nos trabalhos de Pinto et al. (2004; 2006), Oliveira et al. (2009) e Marconi et al. (2011).

Pinto et al. (2004), com o objetivo de avaliar o nível de polimorfismo de marcadores EST-SSRs em cana, utilizaram 30 marcadores desse tipo na análise de 18 dos 83 acessos estudados por Lima et al. (2002). Foram eles: 13 clones comerciais, 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 marcadores, 23 se revelaram polimórficos, com conteúdo de informação de polimorfismo (PIC) médio estimado em 0,66. Também avaliaram o potencial desses marcadores na construção de mapas genéticos, tendo como material de estudo os dois genitores (SP 80-180; SP 80-4966) e seis indivíduos F1 aleatoriamente selecionados. Cinquenta e duas marcas apresentaram segregação nos genitores e na progênie, tendo, portanto, potencial para uso no mapeamento genético de cana.

Em outro trabalho, Pinto et al. (2006) compararam o polimorfismo detectado por 51 EST-SSRs e 50 gSSRs (microsatélites genômicos) nos

mesmos 18 acessos de cana avaliados em Pinto et al. (2004). Constataram que, embora o polimorfismo acessado pelos gSSRs tenha sido maior, as estimativas do poder de discriminação entre genótipos e as estimativas de similaridades genéticas não diferiram entre os tipos de marcadores, havendo correlação significativa entre as similaridades genéticas estimadas pelos EST-SSRs e gSSRs.

Oliveira et al. (2009), por sua vez, testaram 342 marcadores EST-SSRs na análise de 18 variedades de cana estudadas por Pinto et al. (2004; 2006). Na investigação, registraram 224 marcadores polimórficos, sendo que 82,1% se apresentaram funcionais e com elevada homologia com genes conhecidos, tendo muita utilidade em estudos de mapeamento genético, mapeamento de QTLs (*Quantitative trait loci*) e de genômica comparativa, por estarem localizados dentro de regiões funcionais do genoma. Os autores verificaram que 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, revelando a importância desses marcadores em estudos de parentesco, construção de mapas genéticos, por exemplo.

Marconi et al. (2011) também avaliaram os mesmos 18 acessos de cana e confirmaram que 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 de energia.

Vários outros trabalhos, utilizando de marcadores para análise de genótipos de cana, foram desenvolvidos ao longo do tempo, contribuindo para a compreensão do perfil genético de cada complexo estudado. Dentre esses trabalhos, destacamos: Cordeiro et al. (2001), Pan et al. (2004) Cai et al. (2005a, 2005b), Aitken et al. (2006), Suman et al. (2008), Jackson et al. (2010), Chang et al. (2012) e Sharma et al. (2014).

Cordeiro et al. (2001) pesquisaram EST-SSRs de cana e verificaram que tais marcadores são transferíveis para outros gêneros do complexo *Saccharum*, como *Erianthus* e *Sorghum*. Também observaram que o nível de

polimorfismo não foi alto entre as cultivares, mas foi elevado na avaliação dos genitores e acessos de *Erianthus* e *Sorghum*. Diferentemente dos EST-SSRs, os SSRs genômicos apresentaram maior polimorfismo quando empregados na análise de cultivares de cana, não sendo, porém, transferíveis para outros gêneros.

Pan et al. (2004), ao estudarem 33 clones de *S. spontaneum* e duas cultivares de cana, com a utilização de marcadores RAPD, 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 0,61 a 0,75. Na investigação, formaram nove grupos, sendo que oito continham os clones de *S. spontaneum*, e o nono grupo foi formado apenas pelas duas variedades. Verificaram 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 se mostrou 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*),

Cai et al. (2005a) analisaram a relação de *Erianthus rockii*, uma espécie que possui alelos de tolerância ao frio e ao estresse hídrico, com outras dezesseis espécies distribuídas entre os gêneros *Saccharum*, *Erianthus*, *Miscanthus*, *Narenga* e *Sclerosthachya*, todos pertencentes ao complexo *Saccharum*. Eles 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). Os resultados obtidos a partir de ambas as análises de PCA foram semelhantes, sugerindo que *E. rockii* seja distinto das outras espécies de *Erianthus* estudadas, bem como das demais espécies de *Saccharum*. *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. sengalense* e *E. sarpet*).

Num outro estudo, Cai et al. (2005b) utilizaram marcadores 5S rRNA para verificar introgressão de alelos de *E. arundinaceus*, que apresenta

características como boa rebrota, tolerância a estresse hídrico, vigor, resistência a doenças, etc., em *Saccharum*. Os autores aplicaram os marcadores 5S rRNA PCR (*Polimerase Chain Reaction*,) 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.* Afirmaram que essa técnica é importante para explorar alelos de interesse provenientes do germoplasma de *E. arundinaceus* nos programas de melhoramento de cana.

Aitken et al. (2006), utilizando marcadores AFLP, analisaram 421 clones, sendo 270 da espécie *S. officinarum* e 151 cultivares australianas. A partir dos 614 locos polimórficos encontrados, verificaram que os clones oriundos da Nova Guiné apresentaram maior diversidade que os clones originários de outras regiões, corroborando a hipótese de que tal localidade seja o centro de origem da espécie. Os clones do Hawai e de Fiji formaram um grupo separado, apresentando, provavelmente, introgressões de alelos provenientes de outros membros do complexo *Saccharum*. Observaram também maior diversidade entre as cultivares, pois essas possuem introgressões de alelos de *S. spontaneum*.

Com marcadores SRAPs (*Sequence Related Amplified Polymorphisms*), Suman et al. (2008) analisaram 30 genótipos de cana, incluindo acessos de *S. officinarum*, *S. spontaneum*, *S. robustum*, *S. sinense*, *S. barberi*, *Miscanthus*, *Erianthus* e híbridos interespecíficos, que, por sua vez, amplificam regiões genômicas ricas em genes. Os autores constataram um polimorfismo elevado (1135 marcas polimórficas) e a presença de 119 marcadores 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. Chegaram à conclusão de que os marcadores SRAP são importantes para a elaboração de mapas genéticos.

Jackson et al. (2010), com o objetivo de avaliar a diversidade genética de acessos de *S. spontaneum*, utilizaram 676 marcadores AFLPs na

genotipagem de 443 clones da espécie. Com a análise dos componentes principais, e com base nos dados dos marcadores, observaram que eles 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 confirma a ideia de que *S. spontaneum* é a espécie que apresenta maior diversidade dentro do seu gênero. Complementando a investigação, os autores também estudaram 220 clones da espécie *Erianthus arundinaceus* e verificaram que os clones do norte da China apresentavam maior diversidade que os clones da Indonésia, indicando uma tendência de os clones da China se separarem em função de seu local de origem (leste e oeste).

Chang et al. (2012), com o propósito de coletar dados sobre a espécie *S. spontaneum*, utilizada em programas de melhoramento genético de cana e testada na obtenção de cultivares com perfil bioenergético, analisaram 80 plantas provenientes de nove diferentes populações chinesas. 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. Eles utilizaram marcadores moleculares do tipo SRAP, obtendo 185 bandas polimórficas, confirmando predomínio da diversidade intrapopulacional.

### **A técnica TRAP (*Target Region Amplified Polimorphsm*)**

A técnica de TRAP, desenvolvida por Hu e Vick (2003), baseada em PCR, que utiliza ferramentas de bioinformática e expressa informação de banco de dados de sequência (EST) para gerar marcadores polimórficos em torno de sequências de genes candidatos, usa 2 *primers* de 18 nucleotídeos para gerar marcadores. Um dos *primers*, o fixo primário, é projetado a partir da sequência EST direcionada no banco de dados; o *primer* arbitrário é uma sequência arbitrária com um núcleo rico em AT (adenina e timina) ou GC (guanina e citosina) para anelar com um *intron* ou *exon*, respectivamente. A amplificação por PCR é executada para os primeiros 5 ciclos com uma temperatura de 35 ° C, seguido de 35 ciclos com uma temperatura de

anelamento de 50 ° C. Para diferentes espécies de plantas, cada reação de PCR pode gerar até 50 marcas com tamanhos variando de 50-900 pb quando separados em gel de poliacrilamida. Os autores concluíram que a técnica TRAP é útil na genotipagem de coleções de germoplasma e na marcação de genes que regem os traços agronômicos desejáveis das plantas de cultivo.

Várias são as pesquisas já feitas utilizando essa técnica. E, dentre os organismos vegetais que foram estudados, podemos citar: alface, por Hu et al. (2005); trigo, Liu et al. (2005); soja, por Möller (2010); guaraná, Sousa et al. (2012) laranja, por Souza (2010); eucalipto, por Lima (2010); mandioca, por Oliveira et al. (2011); inclusive a própria cana-de-açúcar, a exemplo de Alwala et al. (2006a) e Creste et al. (2010a).

Hu et al. (2005), com a finalidade de demonstrar a aplicabilidade da técnica TRAP na genotipagem da alface, avaliaram 53 cultivares de alface (*Lactuca sativa* L.) e seis acessos selvagens (três de cada uma das duas espécies selvagens, *L. saligna* L. e *L. serriola* L.). Utilizaram 10 *primers* fixos e 4 arbitrários, encontrando um total de 769 fragmentos, variando de 50 a 900 pb de comprimento. Desses, 388 bandas foram polimórficas entre os 59 acessos de *Lactuca* e 107 marcas foram polimórficas entre as 53 cultivares de alface e os seis acessos selvagens; 251 fragmentos estavam presentes apenas nas espécies selvagens. Os marcadores TRAP não só discriminaram todas as cultivares, mas também evidenciaram a relação evolutiva entre as três espécies de alface. Eles chegaram à conclusão que, *L. sativa*, a espécie cultivada, está mais intimamente relacionada com *L. serriola* do que com *L. saligna*. Os resultados encontrados foram consistentes com estudos anteriores usando marcadores RFLP, AFLP e SAMPL (*Selective Amplification of Microsatellite Polymorphic Loci*). Os marcadores TRAP revelaram diferenças significativas na variabilidade genética entre os tipos hortícolas, medida pela semelhança genética média entre as cultivares do mesmo tipo. Os resultados apontaram o potencial da utilização de marcadores TRAP como técnica poderosa para a identificação de cultivares de alface.

Liu et al. (2005), em busca de metodologia mais eficiente e fácil de usar para mapear genomas de plantas, a identificação de *loci* de características quantitativas (QTLs), perfil genotípico, estudos genômicos e seleção assistida por marcadores, propuseram construir um mapa de ligação genética



intervarietal de trigo com base em marcadores microsátélites (SSR) e TRAP, bem como verificar sua utilidade para detectar QTLs. Os autores partiram das premissas de que marcadores de SSR, embora fáceis de usar e eficientes na identificação de polimorfismos, detectam poucos *loci* e que a determinação de polimorfismo pelo uso de marcadores TRAP tem potencial para detectar um grande número de *loci* de uma única reação sem processamento extensivo pré-PCR de amostras.

Na investigação, foram obtidos mais de 700 marcadores para a construção de um mapa de ligação genética. Um mapa de ligação constituído por 352 marcadores representou 3,045 cM com uma densidade média de um marcador por 8,7 cM. Em média, os SSR detectaram 1,9 loci polimórficos por reação, enquanto as TRAPs detectaram 24. Os autores concluíram que ambos os marcadores foram adequados para atribuir grupos de ligação a cromossomos usando clones de trigo. Os resultados indicaram, ainda, que marcadores TRAP são muito eficientes para o mapeamento genético no trigo. Os mapas desenvolvidos se mostraram úteis para a identificação de QTL de qualidade e resistência a doenças que segregam nessa população.

Miklas et al. (2006) verificaram a aplicação de marcadores TRAP no mapeamento e marcação de características de resistência à doenças, em especial do mosaico dourado no feijoeiro, vinculando seis dos 21 marcadores gerados na população de mapeamento, Dorado / XAN 176, com o QTL recentemente identificado e um que confere resistência a vírus do mosaico dourado (BGYMV) e bactérias comuns. Concluíram que marcadores TRAP têm potencial para mapear regiões do genoma do feijoeiro ligado à resistência à doença.

Möller (2010) utilizou a técnica de TRAP para mapear *loci* de resistência quantitativa da soja ao complexo de percevejos sugadores, que são o principal grupo de pragas a causar prejuízo nessa cultura. Foram utilizadas, nesse estudo 286 plantas F<sub>2</sub> provenientes do cruzamento entre cultivares IAC-100 e CD-215. Um mapa genético foi construído com base em marcadores, sendo utilizadas 14 combinações de AFLP, resultando em um total de 643 marcas, das quais 67 (10,42%) foram polimórficas, com média de 4,79 marcas polimórficas por combinação. Ele também utilizou marcadores TRAP em 11 combinações de *primers* fixo/arbitrário, que geraram 230 marcas, sendo 31

polimórficas (13,48%), média de 2,82 marcas polimórficas por combinação, sendo a percentagem de polimorfismo obtida com o marcador TRAP (0,13) foi maior do que para o AFLP (0,10).

O autor também constatou valores moderados para o PIC, com média de 0,37 para ambos os marcadores. Um total de 49 marcadores foi posicionado no mapa de ligação (35 AFLP e 14 TRAP), distribuídos por 12 grupos de ligação, totalizando 696 cM com distância média de 17,93 cM entre marcadores. A análise de marcas simples permitiu a detecção de três e seis QTLs (LOD=2,5), considerando os valores significativos a 5% e 10%, respectivamente. Pelo método de mapeamento por intervalo composto, foram identificados 14 QTLs, referentes a cinco caracteres, distribuídos por oito grupos de ligação. Por fim, identificou uma proporção de 8,94% a 59,97% na variação fenotípica explicada por esses QTLs. Souza (2010), estudando problemas causados pela poliembrionia nas sementes e presença de ciclo juvenil longo em plantas de laranja, construiu mapa de ligação utilizando uma população de 144 híbridos oriunda do cruzamento entre a laranjeira Tobias (CN 1392 e CN 1393), com base em marcadores moleculares SSR e TRAP e com auxílio dos programas *JoinMap* e *OneMap*. Com o programa *JoinMap*, foram obtidas 85 (61%) marcas dispostas em 13 grupos de ligação, totalizando 634 cM, com distância entre os marcadores adjacentes, variando de 0 a 29 cM. Os tamanhos individuais dos grupos de ligação variaram de 8 a 85 cM e um total de 55 (39%) marcadores não se ligou ao mapa.

Por sua vez, o programa *OneMap* obteve 87 (62%) marcadores que se ligaram em 16 grupos, totalizando 1.100 cM, com distância entre marcadores adjacentes variando de 0 a 36 cM. Os tamanhos individuais dos grupos de ligação variaram de 8 a 205 cM e um total de 53 (38%) marcadores não se ligaram no mapa. O programa *OneMap* foi capaz de incluir no mapa a marca que constitui o caráter fenotípico de interesse para florescimento precoce. Foi encontrada similaridade entre os mapas de ligação de híbridos intraespecíficos de laranja doce construídos com os aplicativos *JoinMap* e *OneMap*.

Um mapa genético foi construído por Lima (2010), a fim de evidenciar locos de resistência quantitativa a *Puccinia psidii Winter* em uma progênie de 90 irmãos completos de eucalipto. Foram utilizados marcadores microsatélites, AFLP e TRAP através de uma análise multiponto, com o

mapeamento de QTL por intervalos (IM) e por intervalos compostos (CIM). Foram encontrados 117 marcadores microssatélites, 10 TRAP e 33 AFLP, em 11 grupos de ligação, num total de 1075 cM e distância média de 6,7 cM entre marcadores. O IM identificou um QTL (LOD=7,7) no grupo de ligação 3, que explicou 28,5% da variação na área sob a curva de progresso da doença na progênie observada.

Já a análise CIM detectou dois QTLs, ambos no grupo de ligação 3, sendo que a posição do primeiro QTL foi coincidente com a encontrada no QTL da análise por IM, mas com LOD (10,3), o que explica 39,5% da variação em área sob a curva de progresso da doença. O segundo QTL (LOD=3,4), cujo valor probabilístico máximo distou 39,0 cM do primeiro, explicou 6,9% da variação fenotípica. Os alelos de resistência nos dois QTL encontram-se em repulsão, com efeito aditivo negativo ( $=-0,60$ ) e ausência de dominância no primeiro QTL e efeito aditivo positivo ( $=0,29$ ) e dominância completa ( $=-0,23$ ) no segundo QTL. Concluiu, portanto, que os marcadores ligados aos dois QTLs têm potencial para ser utilizado na seleção assistida, favorecendo a eficiência de seleção de genótipos resistentes.

A Embrapa Amazônia Ocidental, envidando esforços para a conservação clonal da variabilidade genética do guaraná (*Paullinia cupana var. sorbilis* (Mart.) Ducke), também utilizou a técnica de TRAP com o objetivo de aplicar a mesma em diversas análises de diversidade genética em guaranazeiro. Nesse intuito, oito *primers* fixos foram desenhados para sequências relacionadas com proteínas envolvidas no crescimento e desenvolvimento de plantas, juntamente com seis *primers* arbitrários, constituídos por sequências aleatórias utilizadas em reações de PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Das 180 combinações possíveis, 13 foram selecionadas por proporcionarem padrão de amplificação que podem ser otimizado e utilizado como marcador TRAP no guaranazeiro, apresentando número total de bandas que variou entre 5 e 15 com tamanhos entre 80 a 300pb (SOUSA et al., 2012).

Estudando a mandioca, Oliveira et al. (2011) desenharam 99 *primers* fixos e utilizaram 4 *primers* arbitrários no intuito de desenvolver a técnica de TRAP para análises genéticas da planta. Das 396 combinações de iniciadores de TRAP avaliadas, 231 apresentaram polimorfismo nos genótipos analisados.

O número total de bandas variou entre 1 e 12 e o número de bandas polimórficas entre 1 e 9, considerando a presença de pelo menos cinco bandas. Os autores concluíram que a técnica de TRAP permite a seleção de combinações de iniciadores fixos e arbitrários com alto nível de polimorfismo em genótipos de mandioca, o que faz desse tipo de marcador uma opção promissora na genotipagem de germoplasma e na identificação de genes relacionados a características agronômicas desejáveis, de forma a otimizar os ganhos genéticos nos programas de melhoramento.

Quanto à cana-de-açúcar, em estudo comparativo utilizando as técnicas de TRAP, AFLP e dados de pedigree/coeficiente de parentesco (COP), Alwala et al. (2006a) testaram a capacidade dessas técnicas em elucidar a estimativa de similaridade genética (GS), usando nove genótipos de cana-de-açúcar. Foram utilizadas 12 combinações de *primers* TRAP, que produziram 444 marcas, dentre as quais 242 (55%) foram polimórficas, em contraste com o obtido pela técnica de AFLP, que produziu um total de 1325 marcas, sendo 686 polimórficas (53%), usando 28 combinações de *primers*.

No estudo, a GS média obtida através de TRAP foi de 0,75, enquanto a estimativa média de GS para técnica de AFLP foi de 0,76 e para COP foi de 0,12. Os resultados dos dendogramas e de associação levaram os autores a concluir que marcadores moleculares TRAP têm utilidade em estudos de diversidade genética, uma vez que seus valores de percentual de polimorfismo e conteúdo de informação de polimorfismo (PIC) foram semelhantes aos encontrados pelos marcadores AFLP, tendo ainda as estimativas de GS o mesmo nível de precisão.

Creste et al. (2010a), utilizando 82 clones de cana-de-açúcar, aplicaram 4 *primers* de TRAP, relacionados a genes candidatos de tolerância à seca, 5 *primers* de AFLP e 10 *primers* de SSR, a fim de comparar esses diferentes marcadores moleculares na estimação das relações genéticas entre os clones estudados. Encontraram um total de 410 marcas, sendo 160 marcadores TRAP, 103 SSR e 145 AFLPs. As similaridades genéticas entre os acessos, para cada tipo de marcador, foram obtidas por meio do coeficiente de Jaccard, resultando, nos valores de 0,655, 0,522, e 0,675, respectivamente para TRAP, SSR, e AFLP. 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.

### **Marcadores TRAP Relacionados a Genes Candidatos para Metabolismo de Sacarose e para Biossíntese de Lignina.**

A sacarose tem papel crucial no desenvolvimento das plantas, sendo o principal produto da fotossíntese e usado pelas mesmas para o crescimento e acúmulo de reservas. Na cana, a sacarose assume importância ainda maior por se compor o principal produto a ser explorado na cultura (açúcar). Arro (2005), utilizando marcadores TRAP para caracterizar cultivares e clones, estudou genes relacionados à via metabólica da sacarose (SUC), tolerância ao frio (CT) e desenvolvimento de tricoma (TRICH). Os genes ligados ao metabolismo da sacarose foram: a sacarose sintase (Susy), a invertase ácida solúvel (SAI) e a piruvato ortofosfato diquinase (PPDK).

Creste et al. (2010b) conduziram estudo acerca da variabilidade genética em cana-de-açúcar, utilizando marcadores TRAP, sendo sete *primers* fixos desenhados a partir de genes candidatos envolvidos no metabolismo de sacarose e outros três ligados a mecanismos de tolerância à seca. Os genes relacionados à via metabólica da sacarose foram, além dos três já estudados por Arro (2005), Susy, Sai e PPDK, genes candidatos transportadores da sacarose (SUT e SUT4), além da sacarose fosfato sintase (SPS) e as proteínas DirH e DirL. Foi analisada a similaridade genética de 60 genótipos (53 cultivares e 7 espécies).

Os autores concluíram que a variabilidade genética avaliada foi menor para os genes relacionados ao metabolismo de sacarose do que os atrelados à tolerância à seca. Isso reforça o conhecimento tácito de que os programas de melhoramento, desde seus inícios, exerceram uma alta pressão de seleção para o incremento do acúmulo de sacarose nas cultivares de cana, notadamente em detrimento de outras características, além de partirem de um pequeno número de parentais utilizados na hibridação, resultando na limitação dos ganhos do conteúdo de açúcar. Por outro lado, a seleção de genótipos tolerantes à seca, apenas recentemente se iniciou em programas de melhoramento brasileiros. Os resultados obtidos sugerem que os ganhos

produtivos da cultura com novas cultivares, provavelmente, estão mais relacionados com a interação entre genótipo e ambiente.

Alwala et al. (2006b) procederam análises de agrupamento e de coordenadas principais (PCoA – *Principal Coordinate Analysis*), a fim de avaliar a diversidade genética de 30 acessos provenientes dos gêneros *Saccharum*, *Miscanthus* e *Erianthus*, utilizando marcadores TRAP relacionados a genes ligados ao teor de sacarose e à tolerância ao frio. A técnica foi capaz de distinguir os três gêneros, corroborando a classificação taxonômica. Os genótipos de *S. spontaneum*, segundo os autores, para as duas características estudadas, agruparam-se distintamente dos demais do gênero *Saccharum*, que, por sua vez, se misturaram.

O desenvolvimento de tecnologias para obtenção de etanol de segunda geração e da produção de energia elétrica, com base no conteúdo fibroso da cana-de-açúcar, fez crescer o interesse e a necessidade de se estudar esse componente na referida planta, tanto quanto ao seu conteúdo como a composição. No sentido de colaborar e somar conhecimento, Ramos et al. (2001) estudaram sequências expressas (ESTs) em cana-de-açúcar, as quais codificam enzimas ligadas à biossíntese de lignina, que está acoplada ao metabolismo dos fenilpropanóides, que apresentam enzimas compartilhadas com outros processos metabólicos, tais como o ácido caféico O-metil-transferase (COMT). Outras enzimas atuam especificamente na via biossintética da lignina, a exemplo da ferulato-5-hidroxilase (F5H) atuante entre o ferulato e cinamoil-CoA redutase (CCR) e a cinamil álcool dehidrogenase (CAD)

Também analisando a biossíntese da lignina, Suman et al. (2012) utilizaram marcadores moleculares TRAP relacionados a genes candidatos, com *primers* derivados de COMT, CAD, CCR e F5H para acessar a diversidade molecular entre 64 genótipos pertencentes ao Complexo *Saccharum* (CS). Os marcadores foram capazes de diferenciar genótipos pertencentes às diferentes espécies do CS de acordo com o relacionamento genético previamente estabelecido: *Miscanthus*>*Erianthus*>*S. spontaneum*>*S. robustum*/*S. barberi*/*S. sinense*>*S. officinarum*/cultivares.

## CONSIDERAÇÕES SOBRE A REVISÃO

Do que foi exposto, percebemos que a obtenção e a aplicação de marcadores moleculares em estudos de variabilidade genética, na incorporação de características desejáveis e seleção de cultivares melhoradas na cultura de cana-de-açúcar, necessitam de desenvolvimento contínuo, que tornem os referidos marcadores moleculares ferramentas mais robustas, com maior precisão de informação. Nesse contexto, a técnica de TRAP, através da utilização de genes candidatos, se apresenta como alternativa, na busca pela variabilidade genética direcionada a características específicas, a exemplo dos teores de fibra e açúcar e em estudos de caracterização genotípica da cana-de-açúcar.

Por sua vez, o acúmulo de conhecimento da diversidade do Complexo *Saccharum*, para essas características específicas, pode auxiliar no desenvolvimento tanto de cultivares de utilização tradicional quanto destinadas à produção de biomassa para produção de etanol de segunda geração e/ou emprego bioenergético.

## GENETIC DIVERSITY OF SUGARCANE ACCESSIONS VIA TRAP MARKERS OF CANDIDATE GENES RELATED TO LIGNIN BIOSYNTHESIS AND SUCROSE METABOLISM

Carlos Augusto Dias Kanthack Junior<sup>1,2</sup>, João Ricardo Vieira Manechini<sup>3</sup>, Juliana Borges da Costa<sup>3</sup>, Thais Monteiro Favero<sup>3</sup>, Luciana Rossini Pinto<sup>3</sup>, Ronan Xavier Corrêa<sup>4\*</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós Graduação em Produção Vegetal, Universidade Estadual de Santa Cruz – UESC, Ilhéus, BA – Brasil

<sup>2</sup>Estação de Hibridação de Cana do Programa Cana, Instituto Agrônômico de Campinas – Uruçuca, BA – Brasil

<sup>3</sup>Centro de Cana, Instituto Agrônômico de Campinas. Anel Viário Contorno Sul Km 321, CP 206, Ribeirão Preto, SP 14001-970 Brasil.

<sup>4</sup>Centro de Biotecnologia e Genética. Departamento de Ciências Biológicas. Universidade Estadual de Santa Cruz Ilhéus 45662-900 Brasil. e-mail: ronanxc@uesc.br

\* Corresponding author.

### ABSTRACT

Sets of target region amplification polymorphism (TRAP) markers of candidate genes identified for lignin/fiber biosynthesis and sucrose/sugar metabolism were used to estimate the similarity and genetic variability of 96 genotypes belonging to the *Saccharum* Complex, which were previously identified by their origin (accessions, traditional cultivars and modern cultivars). The candidate fiber genes revealed three subpopulations ( $K = 3$ ) with average polymorphic information content (PIC) of 0.30. The highest value was achieved by candidate gene F5H (0.323), and a coefficient of similarity (Jaccard) of 0.38 was obtained



for traditional cultivars. The results obtained from the set of candidate genes for sugar show a distribution of the genotypes studied in two subpopulations ( $K = 2$ ), with the average PIC reaching 0.32. The gene SUT4 (PIC = 0.376) showed the highest polymorphism, and the modern cultivar genotypes presented the highest coefficient of similarity (0.38). The genetic variability for both fiber and sugar TRAP markers is greater in wild accessions than modern cultivars.

**Keywords:** Breeding, Diversity, Fiber, Molecular marker, Sugar.

## INTRODUCTION

Sugarcane is a culture with extreme importance globally. Brazil is the main producing country, with output of 665.6 million tons during the 2015/2016 harvest. In total, this sugarcane output was used to produce 33.5 million tons of sugar and 30.5 billion liters of total ethanol [1].

The existing sugarcane cultivars originated from interspecific hybridizations involving accessions of the genus *Saccharum* (family *Poaceae*, previously classified as *Gramineae*). Some of the main species within the genus *Saccharum* include *S. officinarum* L., *S. spontaneum* L., *S. robustum* J., *S. sinenses* R. and *S. barberi* J. Each of these species has had important agronomic contributions to the formation of new hybrids for high-performance commercial products, such as high-sucrose content, mainly through *S. officinarum*, as well as *S. spontaneum*, due to its the tillering characteristics and cane-ratoon budding ability. In addition to the genus *Saccharum*, the genera *Erianthus*, *Miscanthus*, *Narenga* and *Sclerostachya* can also participate in intergeneric crosses, which form the so-called *Saccharum* Complex together with the genus *Saccharum* [2, 3, 4 and 5].

Recently, with the advent of technologies that propitiate new uses of sugarcane, such as the production of second-generation ethanol from the fiber content of sugarcane as well as the production of bioenergy using the bagasse, cross-breeding programs have been committed to the cultivation of cane biomass or energy cane. In obtaining cultivars for the production of second-generation ethanol and bioenergy, the fiber contents and their composition assume great relevance in selecting new clones.

The agroindustry produces a large quantity of by-products with high fiber content, such as bagasse and straw, and several studies have been conducted to use these by-products as raw materials for producing cellulosic ethanol, energy and products of industrial interest [6, 7].

Lignocellulosic biomass such as sugarcane bagasse is mainly composed of cellulose, hemicellulose and lignin. Sugarcane cultivars have different fiber contents; therefore, it is important to know their composition (mainly cellulose, hemicellulose and lignin) when using their residual materials to generate products with higher added value.

The success of breeding is directly related to the quality/variability of the existing active germplasm banks for each breeding program. It is not only important that collections receive regular contributions from diverse backgrounds but also that the levels of the bank's genetic variability are quantified. In sugarcane, molecular markers have been widely used in studies of genetic diversity and characterization of germplasm [8, 9 and 10]. The target region amplification polymorphism (TRAP) technique uses a dominant marker that combines the ease of random amplification of polymorphic DNA (RAPD) markers but is highly reproducible with the abundant polymorphism of amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers. Polymorphism is generated from the combination of a fixed primer drawn from an expressed sequence tag (EST) of interest and an arbitrary primer [11]. Regarding sugarcane, TRAP markers have been used to access genetic diversity and to identify potential candidate genes associated with tolerance to cold and those involved in the metabolic pathway of sucrose [4].

This same technique was used in a study of sugarcane genotypes from three Brazilian breeding programs, with emphasis on drought tolerance and sucrose metabolism. The results suggested lower genetic variability for genes related to sucrose metabolism when compared to genes linked to drought tolerance [12]. Another study using the TRAP technique inferred the molecular diversity of genotypes belonging to the *Saccharum* Complex and considered candidate genes related to lignin biosynthesis. The authors were able to classify the genotypes according to the previously established genetic relation as well as explain a significant part of the genetic variation. These results can be used as a tool in the development strategy for sugarcane [5].

In order to improve sugarcane, the aim of this work was to characterize different genotypes, mainly from accessions of *S. spontaneum*, *S. officinarum* and commercial cultivars, regarding candidate genes involved in the metabolism of sucrose (sugar) as well as the biosynthesis of lignin (fiber).

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Samples and DNA extraction**

A total of 96 genotypes from the Germplasm Active Bank of the Serra Grande Hybridization Station for the Agronomic Institute of Campinas (IAC), contrasting for fiber and sugar contents, were evaluated, including 66 wild species of different genera and species belonging to the sugarcane complex and so-called accessions (*Saccharum sp.*, *Erianthus sp.* and *Mischantus sp.*), which were purchased from the World Channel Collection/USDA (United States of America); 14 noble sugarcane types (*S. officinarum*); and 16 cultivars and clones known for their agronomic performance and effectiveness as parents [3]. All genotypes were evaluated for the apparent sucrose content of the cane (pol of cane/PC) and fiber percentage, as recommended by the Council of Sugarcane, Sugar and Alcohol Producers of the State of São Paulo [13]. Their genus and/or species were also previously identified (Table 1). Genomic DNA was extracted from 150 mg of leaf macerated in a shredder (Tissuelyser, Quiagen) using the Sigma DNA Genome DNA Kit (Miniprep Kit). The DNA extracted from each sample was quantified using the Nanodrop equipment.

### **Target Region Amplification Polymorphism**

The TRAP markers for candidate genes related to sucrose metabolism and the lignin biosynthesis pathway were used in the present study, and the forward primers drawn from the coding sequence of the respective genes were used in combination with arbitrary primers (reverse), which were marked with infrared dye (IR700 or 800) to detect amplified fragments in a LI-COR® Biosciences NEN4300© DNA Analyzer (Table 2).

The PCR reactions were conducted in a final volume of 15  $\mu$ L containing: 60 ng of DNA, 1x buffer (50 mM KCl and 10 mM Tris-HCL, pH 7.5), 0.5 mM dNTPs, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 units of Taq DNA Polymerase and 1  $\mu$ M fixed (forward) and 1  $\mu$ M arbitrary (reverse) primer marked with infrared (IR) at 700 nm or 800 nm.

The amplification reactions were carried out using a thermocycler (MyTermocycler ®, Bio-Rad) with an initial denaturation step at 94 °C for 2 minutes, followed by 5 cycles at 95 °C for 45 s, 35 °C for 45 s and 72 °C for 1 min; and 35 cycles at 95 °C for 45 s, 50 °C for 45 s and 72 °C for 1 min, with a final extension at 72 °C for 7 min.

After the PCR reaction, 2  $\mu$ L of the two reaction-amplification products (one marked with IR700 and another with IR800 dye) were mixed, and 8  $\mu$ L of milli-Q water and 2  $\mu$ L of 6X formamide buffer of the LiCor analyzer were added. This mixture was denatured at 95 °C for 5 min and then separated with 5% denaturing polyacrylamide gel in the NEM 4300 DNA analyzer.

### **Genotyping and establishment of molecular profiles in the DNA Analyzer**

The obtained markers were analyzed with the Saga™ program (Automated AFLP Analysis Software, with LI-COR® Biosciences), which reads images through molecular weight standards (MWS) or “ladder” (measured in base pairs) to generate a panel with all genotyped markers based on their presence (1) or absence (0).

### **Data analysis**

Genotyping matrix was analyzed with the software Structure v2.3.4 [14] to detect genetic structure and clustering patterns among the sampled genotypes. Procedure was undertaken with number of k (k-value) set from 1 to 10, conducted with 10 iterations at a 100,000 burning period and 200,000 Markov Chain Monte Carlo (MCMC) repeats. The clustering data obtained was submitted to Structure Harvester Software [15] to determine the best number of subpopulations (K) found in the sampled set for candidate genes in terms of sugar and fiber.

Next, the polymorphism information content (PIC) was estimated for each combination (candidate gene + arbitrary primer) in accordance with the expression according to [16].

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2,$$

in which  $p$  is the frequency of the  $j$ -th tag for locus marker  $i$ .

The marker index (MI) was calculated according to [17], wherein  $MI = PIC \times EMR$ , with EMR defined by obtaining the product of the effective multiplex ratio (E) and the PIC. The effective multiplex ratio is, in turn, defined as the product of the total loci per primer ( $n$ ) and the fraction of polymorphic loci ( $\beta$ ).

The relationships with genetic similarity between the groups of studied materials were estimated based on the Jaccard coefficient and visualized by constructing a dendrogram with the program DARwin 6.0 [18]. This software was developed to analyze phylogenetic diversity based on evolutionary dissimilarities.

The sources of variation were identified through a study of molecular variance analysis/AMOVA, using the software Arlequin 3.5.2.2 [19].

## RESULTS AND DISCUSSION

### Polymorphism analysis of the candidate genes involved in the metabolism of fiber (lignin) and sugar (sucrose)

A total of 374 polymorphic markers ranging from 53 to 514 bp were found for all fiber candidate genes, with the ARB4 CAD gene showing the highest number of markers: 152. The candidate gene F5H ARB2 generated the lowest number of polymorphic markers. Among the five evaluated genes, the average number of markers was 93.

The PIC presented by the fiber candidate genes ranged from 0.260 (ARC4 CCR) to 0.323 (F5H ARB2), with an average PIC of 0.30 (Table 3), which was similar to the average found in a study that assessed 16 combinations of primers and genes related to the biosynthesis of lignin/fiber in 64 genotypes of the *Saccharum* Complex and is within the expected range for dominant markers [5]. The highest value obtained by the CAD ARB4 gene for the marker index (14,944) was related to its high effective multiplex ratio (E),

which in turn presents a higher total number of loci per primer (152) but not necessarily greater information of polymorphic content. Although presenting a higher PIC value, the F5H ARB2 candidate gene revealed the lowest verified product between the total number of loci per primer and the fraction of polymorphic loci (E), and resulted in a marker index higher than that of the CCR ARB4 gene.

When comparing the average PIC values obtained between groups of accessions (Table 4), the group formed by the accessions of *S. spontaneum* had higher values than the other groups. This result indicates higher polymorphism for the fiber candidate genes in this species, followed by the traditional cultivars and finally the modern cultivars. This information is consistent with several studies of the role of *S. spontaneum* in the contribution of higher fiber contents in cross-breeding programs to introduce biomass [20 and 21]

The PIC of candidate genes for sugar varied from 0.216 (SUT ARB2) to 0.376 (SUT4 ARB2). The latter also showed the highest number of polymorphic markers (122) out of a total of 517 for the total set of candidate genes evaluated for sugar. The SAI candidate gene, in combination with the arbitrary primer ARB2, showed the lowest number of polymorphic markers (43) (Table 5). The PIC values and the effective multiplex ratio competed equally in obtaining the marker index for the SAI ARB2 and SUT4 ARB2 genes. Despite its high total loci per primer, the SUT ARB2 gene obtained the second lowest effective multiplex ratio, besides having the lowest PIC among the studied genes, which resulted in it having the lowest marker index among the set of candidate genes related to sucrose metabolism.

Similarly to the analysis of the candidate genes involved in fiber metabolism (lignin), when analyzing the PIC values for each group (predominantly *S. spontaneum*, *S. officinarum* accessions and modern cultivars), the highest values were found for the predominant *S. spontaneum* accessions, with the PPDK candidate gene in combination with the arbitrary primer ARB4 having the highest PIC (0.352). This gene also had the highest PIC (0.157) for noble canes (Table 6). In the cultivars group, the PIC values ranged from 0.050 (SUT ARB2) to 0.098 (SPS ARB2). In general, the highest level of polymorphism was observed from the candidate genes involved in

sugar metabolism in the predominant *S. spontaneum* accessions, followed by noble sugarcanes and modern cultivars.

Although modern cultivars have inherited the richness (high sugar content) of the noble sugarcanes (*S. officinarum*), and although the so-called wild accessions — especially *S. spontaneum* — have contributed genetically to characteristics such as high tillering, regrowth and resistance to biotic and abiotic factors, the results presented herein suggest considerable variability among the important genes involved in sugar metabolism in *S. spontaneum* accessions. Part of this polymorphism is likely associated with alleles favorable to the accumulation of sucrose. In fact, significant levels of Brix were reported in *S. barberi* (Kansar, Lalri: 17.1-18.0% sucrose) and *S. spontaneum* (Brix > 16th: SES32A, SES65, SES72, SES96B, SES597 and SES6050) [20].

### **Genetic structure analysis**

In the structural analysis of the candidate genes for fiber, the total set of evaluated genotypes was subdivided into three subpopulations ( $K = 3$ ), as shown in Figure 1 and highlighted respectively in red (subpopulation 1), green (subpopulation 2) and blue (subpopulation 3) in Figure 2. This result partially supports the origins of the genotypes in terms of the respective species or genera, which included traditional cultivars predominated by *S. officinarum*, and accessions predominated by both *S. spontaneum* and modern cultivars.

It was verified that, with the exception of cultivar IACSP96-3060, 15 of the 16 modern cultivars originating from Brazilian cross-breeding programs were allocated to subpopulation 1 (red color), although cultivars IACSP93-2060 and IACSP96-7569 were also shared with subpopulation 3 (in blue). In the first subpopulation, a smaller number of accessions with *S. spontaneum* ancestry were allocated: the genotype identified as SLC92-94 (unknown origin), IJ76-410 (*Erianthus* sp.), IM76-232 (*S. robustum*), Miscanthus (*Miscanthus* sp.), and the traditional cultivars Sabura, Ragnar and Muntok Java. These last few traditional genotypes comprise the largest portion of the first subpopulation (red) but also portions of the third subpopulation (blue), predominantly consisting of *S. spontaneum* accessions, and portions of the second subpopulation (green). Similar results were found in the study conducted with 36 microsatellite markers

in 1002 accessions from the World Collections of Sugarcane and Related Grasses (WCSRG), which also obtained the same number of subpopulations, divided into *S. officinarum*, *S. spontaneum* and hybrids [22].

The second subpopulation (green) was formed predominantly of *S. officinarum*, although accessions known to originate from *S. spontaneum* also make up this subpopulation, in addition to a specimen of *Erianthus* sp. (IJ76-358) and a specimen of *S. sinensis* (UBA DEL NATAL). Traditional cultivars were grouped into this subpopulation.

The blue subpopulation, in turn, was formed by genotypes predominantly from *S. spontaneum*, except for genotypes SM8136 (*Miscanthus* sp.) and cultivar IACSP96-3060.

Although well defined, these three subpopulations showed a certain level of permeability with respect to the presence/absence of individuals in the expected groups. Similar results were observed in a previous study with 30 clones of five species of the *Saccharum* Complex, which focused on inter- and intra-specific relationships using microsatellite markers [8].

In the structure analysis of the candidate genes involved in sugar metabolism (Figure 4), a significant value was obtained for  $K = 2$ , indicating the structuring of the 96 genotypes into two subpopulations: subpopulation 1 (in red) and subpopulation 2 (in green).

The majority of the evaluated genotypes were allocated to the first subpopulation (red color). All modern cultivars from two Brazilian cross-breeding programs presented high proportions of the first subpopulation (red). Several accessions, mainly from *S. spontaneum*, such as *Miscanthus* sp., *S. officinarum* (Ragnar, Sabura and Green German) also show high proportions of this population. The genotypes with predominance of green (second subpopulation) refer to 13 noble sugarcanes, different accessions (1 *Erianthus*, 1 *S. robustum* and 1 *S. sinensis*) and *S. spontaneum* species accessions. No modern cultivar from Brazilian cross-breeding programs had a high proportion of this subpopulation.

Studies of genetic variability in sugarcane carried out with several types of markers have indicated that, although modern cultivars seem to be closer to traditional cultivars, varietal diversity seems to have originated from accessions, in particular from *S. spontaneum* [3, 5 and 21].



## Genetic similarity and clustering analysis for candidate genes

The intra- and intergroup similarity coefficients for the present study were generally low, varying from 0.28 to 0.38 for lignin/fiber and from 0.29 to 0.37 for sugar/sucrose. The lowest coefficient of similarity regarding sucrose metabolism was found between genotypes Ponape Wild Slender and SES297A (0.10), and the highest was between Ceram Red and Formosa (0.69). As for the biosynthesis of lignin, the lowest coefficient was observed between Ponape Wild Slender and SLC9232 (0.09), and the highest was between Kerah and Uba Demerara (0.64).

The range of genetic similarity values was higher for the sugar candidate genes than for the fiber-related gene cluster, but it was also higher for the same genes used in a population comprising cultivars from three Brazilian sugarcane breeding programs, which have shown variation between 0.52 and 0.90 [12].

These results point to great diversity within and among the groups constituting the present study, although not necessarily reflecting the genealogy of the evaluated individuals, as well as an apparent conservation of the regions reached by the candidate genes for both fiber and sugar.

Within the set of candidate genes for fiber, the subpopulation of accessions was diffuse in the dendrogram (Figure 5) to permeate the groups formed by traditional cultivars and by modern cultivars, which corresponds to the recent use of *S. spontaneum* accessions in the later in Brazilian cross-breeding programs as well as to the thesis that attributes the evolution from *S. spontaneum*, through *S. robustum*, to the origin of *S. officinarum* individuals [20].

The same behavior was observed in the dendrogram (Figure 6), wherein the distribution of previously identified groups can be visualized as a function of candidate genes related to the metabolism of sucrose.

The molecular analysis of variance for the candidate gene pools related to the metabolism of sugar (Table 8) and the biosynthesis of lignin (Table 9), as reported by [12], showed that the highest percentage of genetic variability was within the groups (92.15 and 92.50, respectively), rather than among the groups (7.85 and 7.50, respectively).

The similar behavior among the percentages of variation for the different sets of candidate genes adds evidence to the apparent common ancestry of the genotypes involved in the present study and of the *Saccharum* Complex in general.

## CONCLUSIONS

The set of candidate genes related to the biosynthesis of lignin/fiber used with the TRAP technique enabled the identification of the distribution of polymorphism across the three genotype groups of the studied population, generally coinciding with the previously expected distribution of the genotypes in the subpopulations. The highest level of polymorphism was observed in the genotypes identified as accessions, followed by traditional cultivars and modern cultivars.

The use of the TRAP technique with a set of candidate genes linked to the metabolism of sucrose also enabled the identification of only two clusters of the three expected subpopulations, which related the polymorphism of all modern cultivars studied to several accessions. The polymorphism identified by these sugar-related candidate genes in the traditional cultivars, in turn, had affinity with the polymorphism of the studied genera. However, it was not predominant in any of the modern cultivars within the aforementioned subpopulation.

The molecular variance occurred predominantly within the studied subpopulations, rather than between the genotype groups. The values found for the genetic similarities, both for the set of candidate genes related to the sugar content and for the genes linked to fiber levels in sugarcane, indicate that the greatest potential for genetic variability for both characteristics is in the so-called wild accessions.

Finally, the results indicate that the desired genetic variability for breeding programs, for both fiber and sugar increment, can be sought in wild accessions. The results also evidence the close genetic base of the studied traditional and modern cultivars, in addition to corroborating the ancestry theory of *S. spontaneum* on *S. officinarum* and consequently on the current bred genotypes.

## REFERENCES

1. Portal Brasil (2017). Available: <<http://www.brasil.gov.br/economia-e-emprego/2016/04/safra-de-cana-2016-17-cresce-em-producao-e-area>>. Download: 09 apr.
2. Daniels J, Roach BT (1987) Taxonomy and evolution in sugarcane. p. 7-84. In Heinz DJ (ed.) Sugarcane improvement through breeding. Elsevier, Amsterdam.
3. Grivet L, Daniels C, Glaszmann JC, D'hont A (2004) A Review of Recent Molecular Genetics Evidence for sugarcane evolution and domestication. *Ethnobotany Research & Applications* 2:9-17.
4. Alwala S, Suman A, Arro JA, Vermis JC, Kimbeng CA (2006) Target region amplification polymorphism (TRAP) for accessing genetic diversity in sugarcane germplasm collections. *Crop Sci* 46:448-455.
5. Suman A. et al (2012) Molecular diversity among members of the *Saccharum* complex assessed using TRAP markers based on lignin-related genes. *BioEnergy Research* 5:197-205.
6. Yang B, Wyman CE (2008) University of California, Riverside, California. Pretreatment: the key to unlocking low-cost cellulosic ethanol. *Biofuels Bioprod Bioref* 2:26-40.
7. Landell MGA, Scarpari MS, Xavier MA, Anjos IA, Baptista AS, Aguiar CL, Silva DN, Bidóia MAP, Brancalião SR, Bressiani JA, Campos MF, Miguel PEM, Silva TN, Silva VHP, Anjos LOS, Ogata BH (2013) Residual biomass potential of commercial and pre-commercial sugarcane cultivars. *Sci Agric* 70:1.
8. Brown JS, Schnell RJ, Power EJ, Douglas SL, Kuhn DN (2007) Analysis of clonal germplasm from five *Saccharum* species: *S. barberi*, *S. robustum*, *S. officinarum*, *S. sinense* and *S. spontaneum*. A study of inter- and intra species

relationships using microsatellite markers. *Genet Resour Crop Evol* 54:627-648, 2007.

9. Agarwal M, Shrivastava N, Padh H (2008) Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. *Plant Cell Rep* 27: 617-631.

10. Suman A, Kimbeng CA, Edme SJ, Veremis J (2008) Sequence-related amplified polymorphism (SRAP) markers for assessing genetic relationships and diversity in sugarcane germplasm collections. *Plant Genetic Resources, Characterization and Utilization* 6: 222-231.

11. Hu J, Vick BA (2003) Target region amplification polymorphism: a novel marker technique for plant genotyping. *Plant Molecular Biology Reporter* 21:289-294.

12. Creste S, Accoroni KAG, Pinto LR, Vencosvskv R, Gimenes MA, Xavier MA et al (2010) Genetic variability among sugarcane genotypes based on polymorphism in sucrose metabolism and drought tolerance genes. *Euphytica* 172:435-446.

13. CONSECANA (2006) Conselho dos produtores de cana-de-açúcar, açúcar e álcool do estado de São Paulo. Manual de Instruções. 5. ed. Piracicaba.

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

15. Earl, D.; Von-Holdt, B. (2010) STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*, v. 4, n. 2, p. 359–361.

16. Varshney, R.K; Chabane, K; Hendre, P.S.; Agarwal, R.K.; Graner, A. (2007) Comparative assessment of EST-SSR, EST-SNP and AFLP markers for evaluation of genetic diversity and conservation of genetic

resources using wild, cultivated and elite barleys. *Plant Sci.* v.173, p. 638–649.

17. Varshney RK, Bertoli DJ, Moretzsohn MC et al. (2009) The first SSR-based genetic linkage map for cultivated groundnut (*Arachis hypogaea* L.). *Theor Appl Genet* 118: 729. <https://doi.org/10.1007/s00122-008-0933-x>.

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

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

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

21. Oriolo FMY (2016) 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 de Mestrado. APTA. São Paulo.

22. Nayak SN, Song J, Villa A, Pathak B, Ayala-Silva T, Yang X, Todd J, Glynn NC, Kuhn DN, Glaz B, Gilbert RA, Comstock JC, Wang J (2014) Promoting utilization of *Saccharum* spp. genetic resources through genetic diversity analysis and core collection construction. *PLOS ONE* | [www.plosone.org](http://www.plosone.org) 9: e110856.

## Figure Legends

**Fig. 1** Analysis of the best K value (STRUCTURE software). The  $\Delta K/K$  ratio indicates the occurrence of three subpopulations from the total individuals studied regarding the set of candidate genes for fiber.

**Fig. 2** Proportion of subpopulations for each analyzed genotype, obtained from the polymorphism of candidate genes involved in the biosynthesis of lignin (fiber): predominant cultivars (red subpopulation), predominant subpopulation of noble sugarcanes (green) and predominant subpopulation of accessions/*S. spontaneum* (blue).

**Fig. 3** Analysis of the best K value (STRUCTURE software). The  $\Delta K/K$  ratio indicates the occurrence of two subpopulations of the total number of individuals studied regarding the set of candidate genes for sugar.

**Fig. 4** Details on the two subpopulations found in the set of individuals studied regarding candidate genes for sugar: the population of cultivars and diverse accessions (red) and the population of predominantly noble sugarcanes and diverse accessions (green).

**Fig. 5** Dendrogram constructed by grouping unweighted pairs with the average arithmetic analysis of clusters based on genetic similarity (Jaccard coefficient) through candidate genes for lignin/fiber using the TRAP technique.

**Fig. 6** Dendrogram constructed by grouping unweighted pairs with the average arithmetic analysis of clusters based on genetic similarity (Jaccard coefficient) through candidate genes for sugar using the TRAP technique.

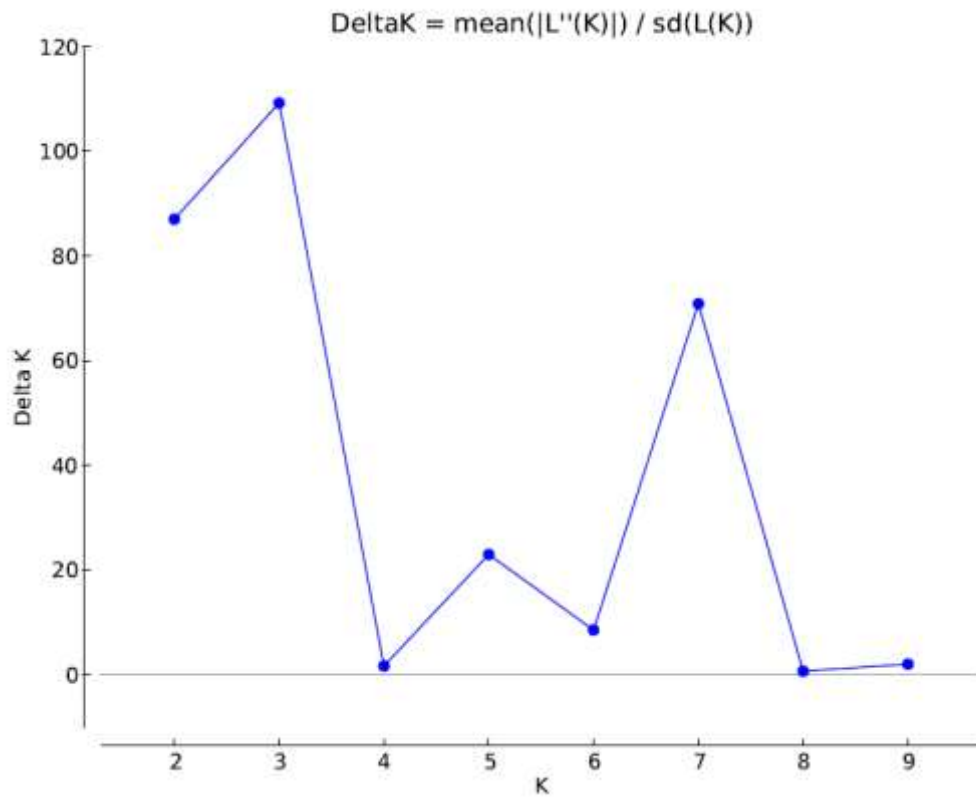


Fig. 1

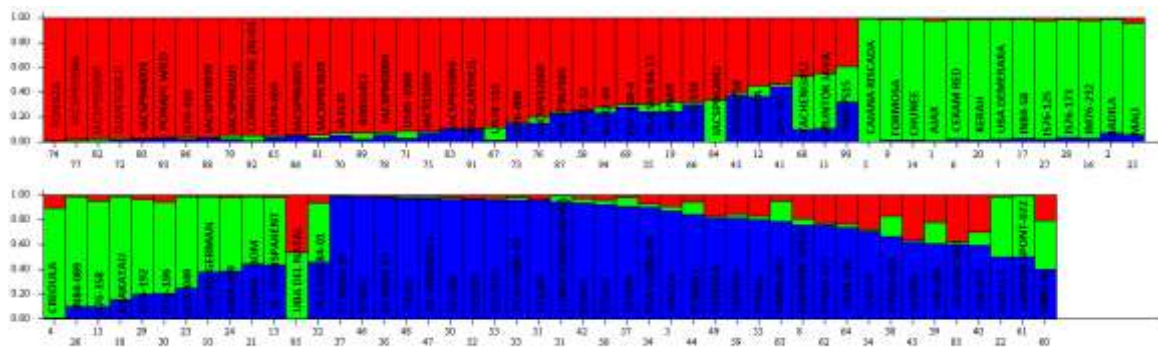


Fig. 2

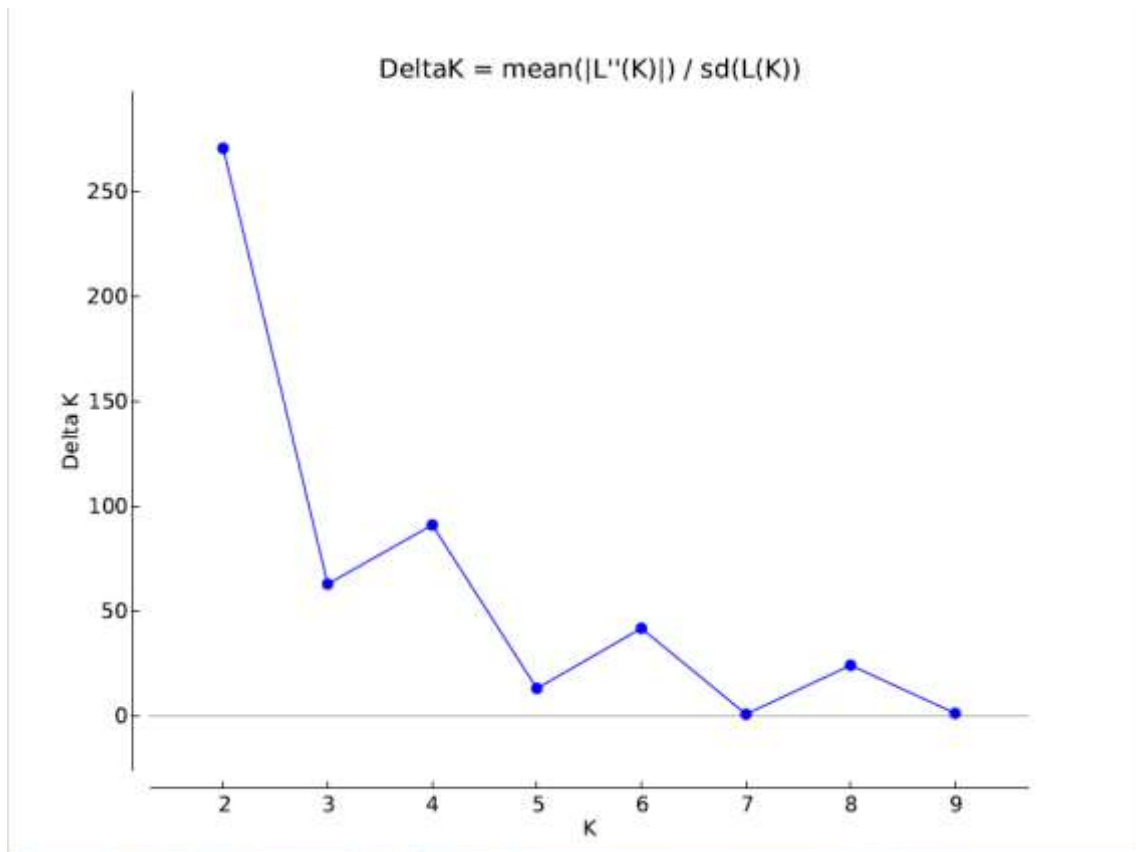


Fig. 3

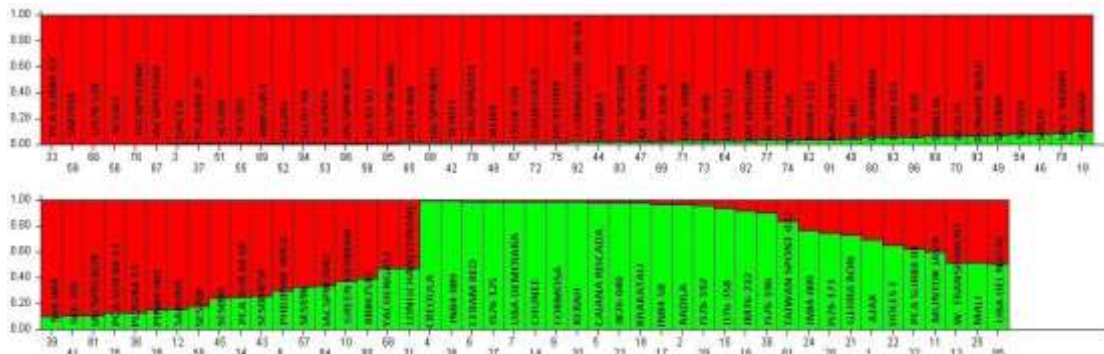


Fig. 4





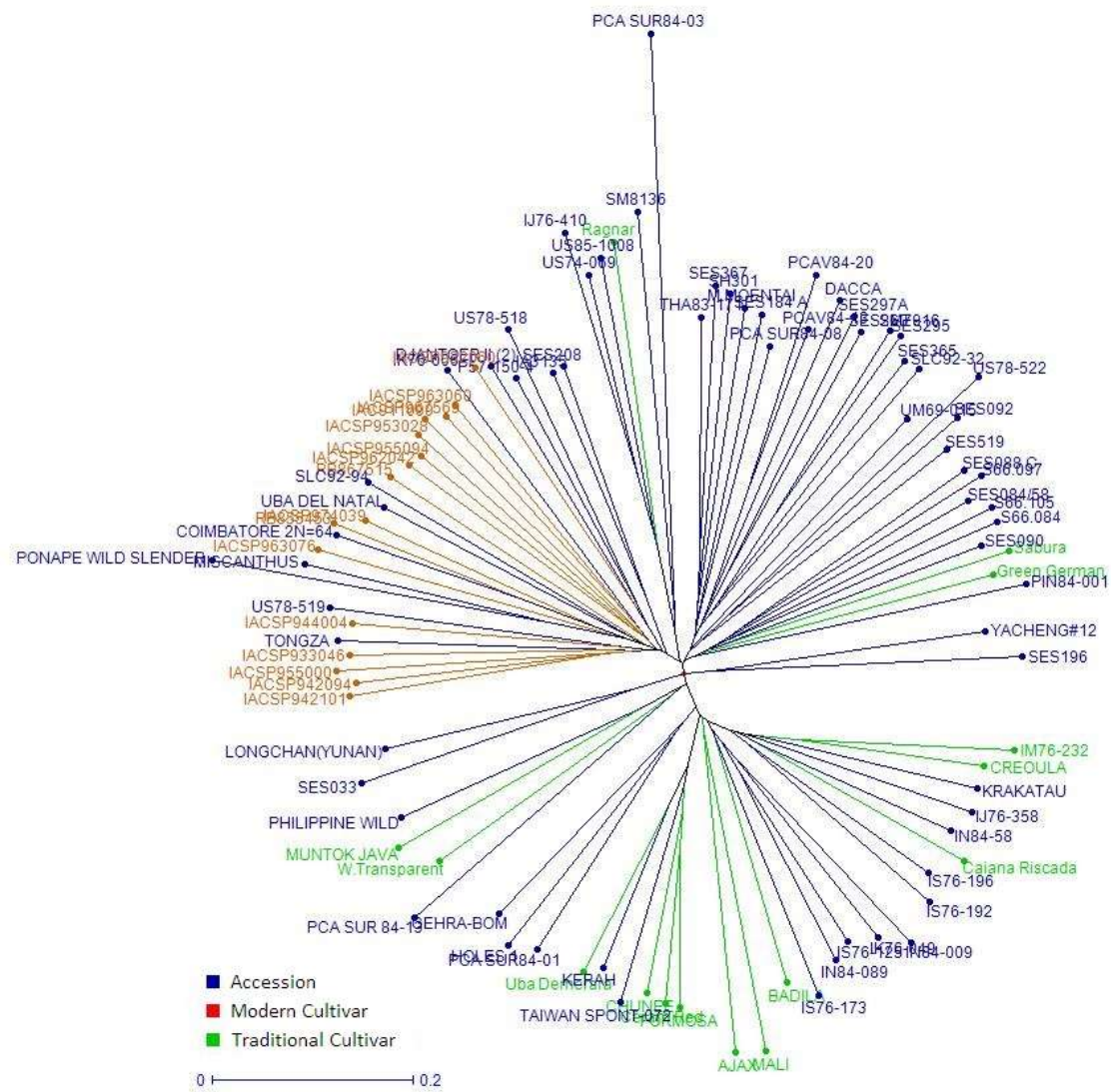


Fig. 6

## Tables

**Table 1.** Genotypes used in the study, sorted and grouped by genus or species with respective percentages of pol and fiber.

Order	GRUPO	Genus or species	Genotype	Pol Cane %	Fiber %
3	ACCESSION	<i>S. spontaneum</i>	DACCA	1.4	31.8
8	ACCESSION	<i>S. spontaneum</i>	PHILIPPINE WILD	1.3	30.2
15	ACCESSION	<i>Erianthus sp.</i>	IJ76-358	2.4	24.5
16	ACCESSION	<i>S. robustum</i>	IM76-232	2.1	21.1
17	ACCESSION	<i>S. spontaneum</i>	IN84-58	3.9	19.5
18	ACCESSION	<i>S. spontaneum</i>	KRAKATAU	2.7	16.6
20	ACCESSION	<i>S. barberi</i> x <i>S. spontaneum</i>	KERAH	1.1	22.2
21	ACCESSION	<i>S. spontaneum</i>	GEHRA-BOM	1.1	25.6
22	ACCESSION	<i>S. spontaneum</i>	HOLES 1	0.7	35.3
23	ACCESSION	<i>S. spontaneum</i>	IK76-049	1.5	24.3
24	ACCESSION	<i>S. spontaneum</i>	IN84-009	2.0	31.3
26	ACCESSION	<i>S. spontaneum</i>	IN84-089	2.0	30.3
27	ACCESSION	<i>S. spontaneum</i>	IS76-125	1.3	26.2

28	ACCESSION	<i>S. spontaneum</i>	IS76-173	1.5	27.8
29	ACCESSION	<i>S. spontaneum</i>	IS76-192	1.0	35.2
30	ACCESSION	<i>S. spontaneum</i>	IS76-196	1.4	33.0
31	ACCESSION	<i>S. spontaneum</i>	LONGCHAN(YUNAN)	0.4	31.4
32	ACCESSION	<i>S. spontaneum</i>	PCA SUR84-01	0.4	41.3
33	ACCESSION	<i>S. spontaneum</i>	PCA SUR84-03	0.1	25.4
34	ACCESSION	<i>S. spontaneum</i>	PCA SUR84-08	0.4	31.4
35	ACCESSION	<i>S. spontaneum</i>	PCA SUR 84-13	0.4	29.5
36	ACCESSION	<i>S. spontaneum</i>	PCAV84-13	1.7	32.0
37	ACCESSION	<i>S. spontaneum</i>	PCAV84-20	1.7	28.8
38	ACCESSION	<i>S. spontaneum</i>	PIN84-001	0.4	33.0
39	ACCESSION	<i>S. spontaneum</i>	S66.084	0.6	24.2
40	ACCESSION	<i>S. spontaneum</i>	S66.097	1.4	32.5
41	ACCESSION	<i>S. spontaneum</i>	S66.105	0.5	34.9
42	ACCESSION	<i>S. spontaneum</i>	SES033	2.2	26.1
43	ACCESSION	<i>S. spontaneum</i>	SES084/58	4.9	29.0
44	ACCESSION	<i>S. spontaneum</i>	SES088 C	2.8	28.7
45	ACCESSION	<i>S. spontaneum</i>	SES090	1.5	20.9
46	ACCESSION	<i>S. spontaneum</i>	SES092	2.3	34.7
47	ACCESSION	<i>S. spontaneum</i>	M.MOENTAI	1.5	29.4
48	ACCESSION	<i>S. spontaneum</i>	SH301	1.1	32.8
49	ACCESSION	<i>S. spontaneum</i>	SES184 A	2.4	26.0
50	ACCESSION	<i>S. spontaneum</i>	SES208	1.6	29.8
51	ACCESSION	<i>S. spontaneum</i>	SES260	1.4	23.6
52	ACCESSION	<i>S. spontaneum</i>	SES295	0.4	31.3
53	ACCESSION	<i>S. spontaneum</i>	SES297A	0.9	29.0
54	ACCESSION	<i>S. spontaneum</i>	SES519	2.5	28.5
55	ACCESSION	<i>S. spontaneum</i>	SES365	2.5	29.7
56	ACCESSION	<i>S. spontaneum</i>	SES367	1.6	30.2
57	ACCESSION	<i>S. spontaneum</i>	SES196	3.3	32.2
58	ACCESSION	<i>S. spontaneum</i>	SLC92-32	2.4	28.8
59	ACCESSION	<i>S. spontaneum</i>	SM7916	2.4	24.3
60	ACCESSION	<i>Sacharum sp. X Miscanthus</i>	SM8136	2.5	22.8
61	ACCESSION	<i>S. spontaneum</i>	TAIWAN SPONT-072	1.7	25.5
62	ACCESSION	<i>S. spontaneum</i>	THA83-171	1.9	26.7
63	ACCESSION	<i>S. spontaneum</i>	UM69-015	1.2	28.5
64	ACCESSION	<i>S. spontaneum</i>	US78-522	1.2	34.8
65	ACCESSION	<i>S. spontaneum</i>	US74-069	1.8	24.9
66	ACCESSION	<i>S. spontaneum</i>	US78-518	1.6	27.7
67	ACCESSION	<i>S. spontaneum</i>	US78-519	3.0	29.8
68	ACCESSION	<i>S. spontaneum</i>	YACHENG#12	2.1	32.2
69	ACCESSION	<i>S. spontaneum</i>	P57-150-4	3.3	22.0
70	ACCESSION	<i>S. spontaneum</i>	IA3135	3.7	23.6
71	ACCESSION	<i>S. spontaneum</i>	US85-1008	2.6	30.5
72	ACCESSION	<i>S. spontaneum</i>	DJANTOER II (2)	1.2	36.7
73	ACCESSION	<i>S. spontaneum</i>	IK76-006	2.2	30.7
74	ACCESSION	<i>S. spontaneum</i>	TONGZA	2.2	36.4
91	ACCESSION	<i>Miscanthus sp.</i>	MISCANTHUS	1.2	18.5
92	ACCESSION	<i>S. spontaneum</i>	COIMBATORE 2N=64	2.9	30.4
93	ACCESSION	<i>S. spontaneum</i>	PONAPE WILD SLENDER	3.2	34.7
94	ACCESSION	<i>S. spontaneum</i>	SLC92-94	3.1	25.0
95	ACCESSION	<i>S. sinensis</i>	UBA DEL NATAL	2.2	19.2
96	ACCESSION	<i>Erianthus sp.</i>	IJ76-410	0.6	22.3
75	MODERN CULTIVAR	<i>Hibrido</i>	IAC911099	13.9	11.5
76	MODERN CULTIVAR	<i>Hibrido</i>	IACSP932060	14.7	10.9
77	MODERN CULTIVAR	<i>Hibrido</i>	IACSP933046	13.1	10.1
78	MODERN CULTIVAR	<i>Hibrido</i>	IACSP942094	12.5	11.4
79	MODERN CULTIVAR	<i>Hibrido</i>	IACSP942101	13.4	10.6
80	MODERN CULTIVAR	<i>Hibrido</i>	IACSP944004	13.2	9.5
81	MODERN CULTIVAR	<i>Hibrido</i>	IACSP953028	14.9	10.6
82	MODERN CULTIVAR	<i>Hibrido</i>	IACSP955000	13.4	11.7
83	MODERN CULTIVAR	<i>Hibrido</i>	IACSP955094	13.7	12.2
84	MODERN CULTIVAR	<i>Hibrido</i>	IACSP962042	13.0	10.7
85	MODERN CULTIVAR	<i>Hibrido</i>	IACSP963060	13.0	11.9
86	MODERN CULTIVAR	<i>Hibrido</i>	IACSP963076	10.5	10.3
87	MODERN CULTIVAR	<i>Hibrido</i>	IACSP967569	13.5	12.9
88	MODERN CULTIVAR	<i>Hibrido</i>	IACSP974039	14.3	11.4
89	MODERN CULTIVAR	<i>Hibrido</i>	RB855453	13.3	11.2
90	MODERN CULTIVAR	<i>Hibrido</i>	RB867515	11.8	11.1
1	TRADITIONAL CULTIVAR	<i>S. officinarum</i>	AJAX	14.7	12.9
2	TRADITIONAL CULTIVAR	<i>S. officinarum</i>	BADILA	16.6	11.5
4	TRADITIONAL CULTIVAR	<i>S. officinarum</i>	CREOULA	12.7	13.2
5	TRADITIONAL CULTIVAR	<i>S. officinarum</i>	Caiana Riscada	15.0	13.5
6	TRADITIONAL CULTIVAR	<i>S. officinarum</i>	Ceram Red	12.8	14.2
7	TRADITIONAL CULTIVAR	<i>S. officinarum</i>	Uba Demerara	11.4	12.3
9	TRADITIONAL CULTIVAR	<i>S. officinarum</i>	FORMOSA	9.8	11.6
10	TRADITIONAL CULTIVAR	<i>S. officinarum</i>	Green German	14.6	12.4
11	TRADITIONAL CULTIVAR	<i>S. officinarum x S. spontaneum</i>	MUNTOK JAVA	9.6	14.1
12	TRADITIONAL CULTIVAR	<i>S. officinarum</i>	Sabura	15.3	11.0
13	TRADITIONAL CULTIVAR	<i>S. officinarum</i>	W. Transparent	12.1	10.1
14	TRADITIONAL CULTIVAR	<i>S. barberi x Sacharum sp.</i>	CHUNEE	13.5	14.0
19	TRADITIONAL CULTIVAR	<i>S. officinarum</i>	Ragnar	14.5	13.3
25	TRADITIONAL CULTIVAR	<i>Sacharum sp.</i>	MALI	16.0	15.1

**Table 2.** Candidate genes related to the biosynthesis of lignin and the metabolism of sucrose used to study 96 genotypes from the Saccharum Complex.

Fixed Primers (Foward)			
Enzyme	Initials	Sequence	Reference
<b>Lignin biosynthetic pathway</b>			
cinnamoyl coA reductase	CCR	ATGACCGTCGTCGACGCCG	Suman et al. 2012 (5)
caffeic acid O-methyltransferase	COMT	TCGGTCATCATCACCAAGAA	Suman et al. 2012(5)
cinnamoyl alcohol dehydrogenase	CAD	ATGGGGAGCCTGGCGTCCG	Suman et al. 2012(5)
ferulate-5-hydroxylase	F5H	ACCACCCTACGTGGACTCAG	Suman et al. 2012(5)
<b>Sucrose metabolismo</b>			
Soluble acid invertase	SAI	AGGACGAGACCACACTCT	
Sucrose synthase-2	SUSY	GGAGGAGCTGAGTGTTTC	Awala et al 2006, Creste et al. 2010 (4, 12)
Sucrose-Phosphate Synthase	SPS	CTACTTCGTCGAGGAGGT	Creste et al. 2010 (12)
Sugar transporter	SUT	GATTTGAATACCCTTGGAC	Creste et al. 2010 (12)
Sucrose transporter ZMSUT4	SUT4	GATGGTGTGAGGATGGGTTC	Creste et al. 2010(12)
Pyruvate orthophosphate dikinase)	PPDK	CGTAAAGATTGCTGTGGA	Khan et al. 2011 (14)
<b>Arbitrary primers (reverse)</b>			
Initials	Sequence		Reference
ARB2	GACTGCGTACGAATTGAC		Li and Quiros (2001) (15)
ARB4	GACTGCGTACGAATTTGA		Li and Quiros (2001) (15)

**Table 3.** Polymorphism information content (PIC) as a function of candidate genes related to the biosynthesis of fiber with respective marker index (MI) values, the effective multiplex ratio (E), and the total loci per primer (n).

Fiber	PIC	MI	E	N
CAD ARB4	0.314	14.944	47.656	152
CCR ARB4	0.260	4.905	18.854	79
COMT ARB4	0.295	6.248	21.146	90
F5H ARB2	0.323	5.274	16.344	53

**Table 4.** Polymorphism information content (PIC) as a function of candidate genes related to the biosynthesis of fiber, detailed with regard to the three inferred clusters. The marker index values (MI), effective multiplex ratio (E) and total loci per primer (n) are displayed.

PIC Accessions				
Fiber	PIC	MI	E	N
CAD ARB4	0.245	11.334	40.172	152
CCR ARB4	0.270	5.004	18.563	79
COMT ARB4	0.219	4.314	19.672	90
F5H ARB2	0.222	3.544	15.953	53
PIC Traditional cultivars				
Fiber	PIC	MI	E	N
CAD ARB4	0.104	5.882	56.375	79
CCR ARB4	0.111	2.218	19.937	90
COMT ARB4	0.076	1.305	17.125	53
F5H ARB2	0.059	1.031	17.625	

PIC Modern cultivars				
FIBRA	PIC	MI	E	N
CAD ARB4	0.081	3.630	44.875	152
CCR ARB4	0.090	1.696	18.937	79
COMT ARB4	0.073	2.266	31.063	90
F5H ARB2	0.104	1.733	16.625	53

**Table 5.** Polymorphism information content (PIC) as a function of candidate genes related to the metabolism of sucrose, with respective marker index values (MI), effective multiplex ratio (E) and total loci per primer (n).

Sugar	PIC	MI	E	N
SAI ARB2	0.278	2.678	9.635	43
SPS ARB2	0.354	10.860	30.646	89
SUSY ARB2	0.319	6.634	20.771	85
SUT ARB2	0.216	3.879	17.969	113
SUT4 ARB2	0.376	17.469	46.427	122
PPDK ARB4	0.356	10,064	28.292	65

**Table 6.** Polymorphism information content (PIC) as a function of candidate genes related to the metabolism of sucrose, detailing the function of the inferred clusters. The marker index values (MI), effective multiplex ratio (E) and total number of loci per primer (n) are displayed.

PIC Accessions				
Sugar	PIC	MI	E	N
SAI ARB2	0.230	2.288	9.969	43
SPS ARB2	0.311	9.403	30.215	89
SUSY ARB2	0.228	4.341	19.000	85
SUT ARB2	0.165	2.933	17.723	113
SUT4 ARB2	0.322	14.662	45.477	122
PPDK ARB4	0.352	10.130	28.815	65
PIC Traditional Cultivars				
Sugar	PIC	MI	E	N
SAI ARB2	0.068	0.577	8.500	43
SPS ARB2	0.115	3.495	30.500	89
SUSY ARB2	0.112	3.149	28.000	85
SUT ARB2	0.049	0.781	15.944	113
SUT4 ARB2	0.139	7.012	50.611	122
PPDK ARB4	0.157	4.877	31.056	65
PIC Modern Cultivars				
Sugar	PIC	MI	E	N
SAI ARB2	0.057	0.543	9.538	43
SPS ARB2	0.098	3.241	33.000	89
SUSY ARB2	0.059	1.158	19.615	85
SUT ARB2	0.050	1.092	22.000	113
SUT4 ARB2	0.093	4.228	45.385	122
PPDK ARB4	0.084	1.833	21.846	65

**Table 7.** Average genetic similarity (GS) coefficients for the set of candidate genes related to the metabolism of sucrose and the biosynthesis of lignin.

<b>Sucrose/Sugar</b>			
	Accession	Modern Cultivar	Traditional Cultivar
ACCESSION	0.29	-	-
MODERN CULTIVAR	0.31	0.38	-
TRADITIONAL CULTIVAR	0.30	0.29	0.37
<b>Lignin/Fiber</b>			
	Accession	Modern Cultivar	Traditional Cultivar
Accession	0.29	-	-
Modern Cultivar	0.32	0.35	-
Traditional Cultivar	0.30	0.28	0.38

**Table 8.** Analysis of molecular variance among sugarcane varieties from the accessions, traditional and modern cultivars on TRAP markers derived from sugar metabolism genes

Source of variation	df	Sum of squares	Variance components	Percentage of variation
Among groups	2	470.347	6.778 Va	7.85
Within groups	93	7399.758	79.567 Vb	92.15
Total	95	7870.104	86.345	

**Table 9.** Analysis of molecular variance among sugarcane varieties from the accessions, traditional and modern cultivars on TRAP markers derived from lignin/fiber biosynthesis genes

Source of variation	df	Sum of squares	Variance components	Percentage of variation
Among groups	2	311.280	4.409 Va	7.50
Within groups	93	5060.554	54.414 Vb	92.50
Total	95	5371.833	58.824	

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar da complexidade genética da cana-de-açúcar, a qual ainda proporciona desafios na aplicação de marcadores moleculares para a seleção assistida, a utilização dos mesmos na caracterização e organização da variabilidade genética de bancos de germoplasma pode colaborar no desenvolvimento de novas variedades. Nesse contexto, o desenvolvimento de marcadores ligados a genes candidatos relacionados a características de interesse (resistência a doenças, tolerância a seca, teores de açúcar e fibra) aponta no sentido de encurtar o caminho da obtenção de cultivares melhoradas mais eficientes.

A técnica de TRAP possibilitou que fosse observado polimorfismo para o conjunto de genes candidatos relacionados à biossíntese de lignina/fibra existente nos três agrupamentos de genótipos da população estudada, coincidindo, de maneira geral, com a distribuição previamente esperada dos genótipos nas respectivas subpopulações. O maior polimorfismo para tais genes candidatos foi encontrado nos genótipos identificados como acessos, seguidos pelas cultivares tradicionais e, finalmente, pelas cultivares modernas. Para os genes candidatos relacionados à biossíntese de lignina/fibra, o maior polimorfismo não está nas cultivares ou nos genótipos melhorados, mas nos acessos ditos selvagens, que se relaciona ao fato de essa característica só ter levantado interesse nas últimas décadas.

O uso da mesma técnica (TRAP), com um conjunto de genes candidatos ligados ao metabolismo de sacarose, permitiu identificar apenas dois agrupamentos dos três inicialmente esperados (acessos, cultivares tradicionais e cultivares modernas), relacionando à totalidade de cultivares modernas estudadas com diversos acessos. O agrupamento obtido com base nos genes candidatos do metabolismo de sacarose reflete em parte o processo de nobilitação, de forma que genes ligados ao incremento dos teores de açúcar, tanto de genótipos de *S. officinarum* quanto de *S. spontaneum*, foram incorporados nos programas de melhoramento, mais uma vez evidenciando a estreita base genética existente nos referidos programas.

Quando analisada a variância molecular, observou-se que ela ocorreu predominantemente dentro das subpopulações estudadas do que entre os referidos grupos. Os valores encontrados para as similaridades genéticas, tanto para o conjunto de genes candidatos relacionados aos teores de açúcar quanto para os genes ligados aos níveis de fibra, indicam que o maior potencial de variabilidade genética para ambas as características encontram-se nos denominados acessos selvagens.

As informações levantadas apontam que a desejada variabilidade genética para os programas de melhoramento, tanto para o incremento de fibra, como de açúcar, pode ser buscada nos ditos acessos selvagens, evidenciando também a estreita base genética das cultivares tradicionais e cultivares modernas estudadas, além de corroborar a teoria da ancestralidade de *S. spontaneum* sobre *S. officinarum* e, conseqüentemente, nos genótipos melhorados atuais.

Por fim, os resultados do presente estudo geram a perspectiva e a necessidade de desdobramentos de novas pesquisas, no sentido de se verificar a correlação entre os dados genotípicos levantados com genes candidatos via técnica de TRAP e resultados morfo-fisiológicos de teores de fibra e açúcar da população estudada. Outra possibilidade é estudar a segregação em progênie dos genes candidatos estudados no presente trabalho, utilizando-se de parentais contrastantes para as características de teor de fibra e açúcar. Com isso, poderão vislumbrar informações adicionais para corroborar a relevância do uso de genes candidatos através da técnica de TRAP, como importante ferramenta no melhoramento genético da cana-de-açúcar, a fim de auxiliar, portanto, no desenvolvimento de todo o potencial bioenergético de utilização da referida cultura.



## REFERÊNCIAS

AGARWAL, M. et al. 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.

ALWALA, S. et al. TRAP, A new tool for sugarcane breeding: comparison with aflu and coefficient of parentage. **Journal American Society Sugar Cane Technologists**, v. 26, p. 62-86, 2006a.

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

ALWALA, S.; KIMBENG, 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, p. 69- 96, 2010.

ARRO, J. A. Genetic diversity among sugarcane clones using target region amplification polymorphism (TRAP) markers and pedigree relationships. University of the Philippines, Los Baños, 2005.

AUSTRALIAN GOVERNMENT. The Biology and Ecology of Sugarcane (Saccharum spp. hybrids) in Australia, 2004. Disponível em: <[http://www.oqtr.gov.au/internet/oqtr/publishing.nsf/Content/sugarcane-3/\\$FILE/biologysugarcane.pdf](http://www.oqtr.gov.au/internet/oqtr/publishing.nsf/Content/sugarcane-3/$FILE/biologysugarcane.pdf)> Acessado em: 14 ago. 2016.

BESSE, P. et al. Characterisation of Erianthus sect. Ripidium and Saccharum germplasm (Andropogoneae-Saccharinae) using RFLP markers. **Euphytica**, v.93, p.283-292, 1997.

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

BRESSIANI, J. A. **Seleção seqüencial em cana-de-açúcar**. (Tese doutorado). Piracicaba: ESALQ/USP, 2001.

BROWN J. S. et al. Analysis of clonal germplasm from five Saccharum species: S. barberi, S. robustum, S. officinarum, S. sinense and S. spontaneum. A study of inter- and intra species relationships using microsatellite markers. **Genet. Resour. Crop Evol**, v. 54, p. 627–648, 2007.

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.

CARLINI-GARCIA, L. A. et al. Aplicação de marcadores moleculares no melhoramento genético da cana-de-açúcar. **Pesquisa & Tecnologia**, vol. 9, n. 12, Jul-Dez, 2012. Disponível em: <[www.aptaregional.sp.gov.br/index](http://www.aptaregional.sp.gov.br/index)>. Acesso em: 25 jun. 2015.

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**, mar. 4(1), 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.

CONAB. Disponível em: <[www.conab.gov.br/.../17\\_08\\_24\\_08\\_59\\_54\\_boletim\\_cana\\_portugues](http://www.conab.gov.br/.../17_08_24_08_59_54_boletim_cana_portugues)>. Acesso em: 11 nov. 2017.

CORDEIRO, G. et al. Microsatellite markers from sugarcane (*Saccharum* spp.) ESTs cross transferable to *erianthus* and *sorghum*. **Plant Science**, Amsterdam, v. 160, n. 6, p.1115 -1123, 2001.

CRESTE, S. et al. O. A biotecnologia como ferramenta para o melhoramento genético. In: DINARDOMIRANDA, L. L. et al. ; VASCONCELOS, A. C. M.; LANDELL, M. G. A. (Ed.). **Cana-de-açúcar**. Campinas: Instituto Agrônômico, p. 157-176, , 2008.

CRESTE, S. et al. Comparison of AFLP, TRAP and SSRs in the estimation of genetic relationships in sugarcane. **Sugar Tech**, 12(2) : 150-154, 2010a.

CRESTE S. et al. Genetic variability among sugarcane genotypes based on polymorphism in sucrose metabolism and drought tolerance genes. **Eupytica** 172, p. 435–446, 2010b.

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

DANIELS, J.; ROACH, B. T. Taxonomy and evolution. In: HEIZ, D. J. (Ed.). **Sugarcane improvement through breeding**. Amsterdam: Elsevier, v. 1, 1987, p. 7-84.

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

HU, J. et al. Application of the TRAP technique to lettuce (*Lactuca sativa* L.) genotyping. **Euphytica**, 144, p. 225–235, 2005.

EDMÉ S. J. et al. Genetic segregation of microsatellite markers in *Saccharum officinarum* and *S. spontaneum*. **Heredity**, 97, p. 366-375, 2006.

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

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

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

HU, J.; VICK, B. A. Target region amplification polymorphism: a novel marker technique for plant genotyping. **Plant Molecular Biology Reporter**, n. 21, p. 289 - 294, 2003.

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**, v. 99, pp 171–184, 1999.

LANDELL, M. G. DE A.; PINTO, L. R. **Tópicos da Cultura da Cana-de-Açúcar - Melhoramento genético e manejo varietal em cana-de-açúcar**: histórico, variabilidade, seleção, obtenção de variedades, conceitos de manejo varietal e principais variedades. Campinas: Instituto Agrônomo, 2009.

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

LIMA, B. M. **Mapeamento de locos de resistência quantitativa a *Puccinia psidii* Winter em uma progênie de irmãos completos de eucalipto**. 2009. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, University of São Paulo, Piracicaba, 2010. doi:10.11606/D.11.2010.tde-19022010-084342. Acesso em: 2017-12-16

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

LIU, Z. H. et al. A wheat intervarietal genetic linkage map based on microsatellite and target region amplified polymorphism markers and its utility for detecting quantitative trait loci. **Theor Appl Genet.** 111(4), p. 782-794, 2005.

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, 1994 a.

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

MACHADO, F. B. P. O açúcar nos 500 anos do Brasil. **Revista STAB**, Piracicaba, v. 18, n. 5, p. 4-15, 2000.

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

MIKLAS, P. N. et al. Potential application of TRAP (targeted region amplified polymorphism) markers for mapping and tagging disease resistance traits in common bean. **Crop Science**, v. 46, p. 910-916, 2006.

MING, R. et al. Sugarcane.Improvement through breeding and biotechnology. **Plant Breeding Reviews**, v. 27, p.15 - 118, 2006.

MÖLLER, M. **Mapeamento de locos de resistência quantitativa da soja ao complexo de percevejos**. 2010. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

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.

OGATA, B. H. **Caracterização das frações celulose, hemicelulose e lignina de diferentes genótipos de cana-de-açúcar e potencial de uso em biorrefinarias**. Piracicaba, SP: ESALQ/USP, 2013.

OLIVEIRA, G. A. F. et al. Desenvolvimento da técnica de TRAP (Target Region Amplification Polymorphism) para análises genéticas em mandioca. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MANDIOCA, 14. FEIRA BRASILEIRA DA MANDIOCA, Maceió. **Anais**, 2011.

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. 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.

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.

PIRES, C. E. L.S. **Diversidade genética de variedades de cana-de-açúcar (Saccharum spp) cultivadas no Brasil**. Piracicaba, SP: ESALQ/USP, 1993.

POMMER, C. V.; BASTOS, C. R. Genealogia de variedades IAC de cana-de-açúcar: vulnerabilidade genética e necessidade de programas básicos de melhoramento. **Pesq. Agropec. Bras.**, 19(5), p. 623 - 629, 1984.

PORTAL BRASIL. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/economia-e-emprego/2016/04/safra-de-cana-2016-17-cresce-em-producao-e-area>>. Acesso em: 09 abr. 2017.

RAMOS, R. L. B. et al. Sugarcane expressed sequences tags (ESTs) encoding enzymes involved in lignin biosynthesis pathways. **Genet. Mol. Biol.** vol.24, n.1-4, pp.235-241, 2001.

RESENDE, M. D. V. de. **Genética biométrica e estatística no melhoramento de plantas**. Informação Tecnológica. Brasília: EMBRAPA, 2002.

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.

SHRIVASTAVA A. K.; SHRIVASTAVA S. Diversity of the germplasm of *Saccharum* species and related genera available for use in directed breeding programmes for sugarcane improvement. **Current Science**, v. 111 (3), 2016.

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.

SUMAN, A. et al. Molecular Diversity Among Members of the *Saccharum* Complex Assessed Using TRAP Markers Based on Lignin-Related Genes. **BioEnergy Research**, Volume 5, p. 197-205, 2012.

SOUZA, L. B. **Mapeamento genético de híbridos intraespecíficos de laranja doce [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck], obtidos por cruzamentos controlados**. 2010. Dissertação (Mestrado em Biologia na Agricultura e no Ambiente) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

SOUZA, S. B. et al. Desenvolvimento da técnica TRAP (Target region amplification polymorphism) para caracterização genética de guaranazeiro. In:

CONGRESSO BRASILEIRO DE RECURSOS GENÉTICOS. Belém, PA. **Anais**. Belém, 2012.

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.

VENCOVSKY, R.; BARRIGA, P. **Genética biométrica no fitomelhoramento**. Ribeirão Preto: Revista Brasileira de Genética, 1992. 496p

## ANEXOS

No intuito de verificar a segregação dos genes candidatos para fibra e açúcar, foi realizado cruzamento tipo recíproco de número 192 (genitor masculino US851008 e genitor feminino IACSP933046), no dia 13 de maio de 2014, durante a campanha de hibridação. Os genitores envolvidos no cruzamento citado são os genótipos de números 71 (*S.spontaneum*/Grupo Acessos) e 77 (híbrido/Grupo Cultivar moderna), respectivamente na lista de indivíduos do presente estudo. Esses genótipos são contrastantes tanto para os teores de fibra como de açúcar. Após semeadura, a progênie (197 indivíduos) do cruzamento foi conduzida em campo e realizada caracterização fenotípica dos percentuais de fibra e açúcar (Pol da cana), a fim de posterior caracterização genotípica via genes candidatos para fibra e sacarose, utilizando a técnica de TRAP.

**Tabela: Análise tecnológica de genótipos do Complexo *Saccharum***

Var.	Brix	Leit POL	Leit. SAC	PBU	POL cald.	Fibra	Pureza	POL cana	AR	umidade	ATR
01	8.8	18.79	19.24	130.54	4.84	11.32	55	4.15	1.50	81.14	53.11
03	8.67	17.62	18.07	120.64	4.55	10.53	52.48	3.95	1.60	81.94	52.12
04	8.06	15.59	16.04	128.85	4.05	11.18	50.25	3.48	1.65	81.90	48.04
05	9.51	21.53	21.98	128.82	5.52	11.18	58.04	4.74	1.42	80.65	57.99
06	10.15	24.54	24.98	130.77	6.26	11.34	61.67	5.36	1.31	79.97	62.91
08	8.49	16.63	17.08	132.44	4.31	11.47	50.77	3.68	1.62	81.27	49.78
10	9.24	21.06	21.51	108.54	5.41	9.56	58.55	4.78	1.44	82.28	58.55
11	8.97	20.53	20.98	117.84	5.28	10.3	58.86	4.60	1.41	81.88	56.66
12	8.08	16.07	16.52	115.73	4.17	10.13	51.61	3.65	1.64	82.80	49.54
13	7.57	14.17	14.63	124.12	3.7	10.81	48.88	3.20	1.70	82.65	45.83
14	9.11	21.27	21.72	134.53	5.46	11.64	59.93	4.65	1.35	80.60	56.55
15	11.48	31.38	31.82	110.56	7.93	9.72	69.08	6.98	1.12	80.17	76.66
16	9.59	21.7	22.15	115.12	5.56	10.09	57.98	4.87	1.45	81.52	59.43
17	9.31	22.16	22.61	135.25	5.68	11.7	61.01	4.84	1.32	80.38	57.99
18	7.52	13.26	13.72	118.43	3.47	10.35	46.14	3.02	1.79	83.10	45.03
19	8.34	15.94	16.39	145.95	4.14	12.55	49.64	3.47	1.63	80.45	47.79
20	9.99	24.09	24.53	128.89	6.15	11.19	61.56	5.28	1.31	80.23	62.20
21	7.89	15.23	15.69	127.67	3.96	11.09	50.19	3.41	1.65	82.12	47.39
22	8.44	19.03	19.48	119.78	4.91	10.46	58.18	4.27	1.43	82.20	53.62
23	7.23	11.63	12.09	120.25	3.06	10.5	42.32	2.66	1.90	83.22	42.55
24	6.51	9.2	9.66	125.15	2.46	10.89	37.79	2.12	2.02	83.49	38.55
25	8.16	16.93	17.38	120.03	4.39	10.48	53.8	3.82	1.56	82.43	50.48
26	10	24.91	25.35	120.08	6.35	10.48	63.5	5.52	1.27	80.83	64.09
27	8.31	16.9	17.35	150.1	4.38	12.88	52.71	3.65	1.53	80.19	48.63

28	7.77	12.72	13.18	133.38	3.33	11.55	42.86	2.84	1.85	81.82	43.84
29	9.06	18.11	18.56	142.34	4.67	12.26	51.55	3.94	1.58	80.10	51.79
30	8.75	18.98	19.43	107.94	4.89	9.51	55.89	4.32	1.52	82.76	54.96
31	11.86	31.96	32.40	128.74	8.06	11.18	67.96	6.92	1.13	78.63	76.13
32	8,88	19.12	19.57	129.26	4.93	11.22	55.52	4.23	1.49	81.16	53.80
33	9.11	19.71	20.16	128.7	5.07	11.17	55.65	4.36	1.49	81.00	54.96
34	7.31	10.45	10.91	131.51	2.76	11.4	37.76	2.36	2.01	82.35	40.66
35	8.96	19.42	19.87	140.66	5	12.13	55.8	4.22	1.46	80.30	53.45
36	8.07	15.14	15.60	116.58	3.94	10.2	48.82	3.44	1.72	82.75	48.33
37	7.8	13.48	13.94	141.92	3.52	12.23	45.13	2.97	1.77	81.19	44.26
38	7.23	10.45	10.91	139.7	2.76	12.05	38.17	2.34	1.97	81.83	40.10
39	9.84	23.17	23.62	134.4	5.92	11.63	60.16	5.05	1.34	79.98	60.23
40	9.01	19.96	20.41	135.7	5.14	11.73	57.05	4.37	1.43	80.60	54.63
41	10.33	25.06	25.50	125.02	6.38	10.88	61.76	5.51	1.31	80.20	64.37
42	8.93	20.88	21.33	127.4	5.37	11.07	60.13	4.62	1.36	81.25	56.31
43	7.45	11.38	11.84	106.08	3	9.36	40.27	2.66	2.00	84.04	43.44
44	9	19.52	19.97	137.25	5.02	11.86	55.78	4.26	1.47	80.50	53.87
45	8.95	19.34	19.79	125.25	4.98	10.9	55.64	4.30	1.50	81.38	54.48
46	7.95	15.89	16.34	116.92	4.13	10.23	51.95	3.61	1.62	82.83	49.04
47	9.64	21.98	22.43	118.18	5.63	10.33	58.4	4.91	1.43	81.27	59.66
48	9.61	20.27	20.72	114.08	5.2	10	54.11	4.56	1.56	81.58	57.57
49	7.73	14.61	15.07	105.02	3.81	9.28	49.29	3.38	1.73	83.86	47.86
50	8.72	19.39	19.84	122.36	5	10.66	57.34	4.33	1.45	81.78	54.41
51	6.86	10.28	10.74	105.76	2.73	9.34	39.8	2.42	2.02	84.58	41.30
52	8.36	18.41	18.86	116.7	4.76	10.21	56.94	4.16	1.47	82.49	52.94
53	9.26	16.68	17.13	128.39	4.31	11.15	46.54	3.70	1.76	80.89	51.19
54	12.03	34.23	34.66	111.92	8.62	9.83	71.65	7.58	1.04	79.60	81.59
55	7.72	15.04	15.50	110.2	3.92	9.69	50.78	3.45	1.67	83.51	48.04
56	8.38	16.97	17.42	117.97	4.39	10.31	52.39	3.83	1.61	82.38	51.01
57	9.73	23.19	23.64	144.77	5.93	12.46	60.95	4.98	1.30	79.37	59.24
58	8.04	14.47	14.93	121.34	3.77	10.58	46.89	3.27	1.76	82.44	47.13
59	9.24	19.88	20.33	123.71	5.11	10.77	55.3	4.42	1.51	81.24	55.76
60	11.27	29.15	29.59	126.45	7.38	10.99	65.48	6.36	1.20	79.30	71.46
61	7.91	12.09	12.55	165.15	3.17	14.09	40.08	2.59	1.85	79.45	41.40
63	7.63	12.78	13.24	118.48	3.35	10.35	43.91	2.92	1.86	83.00	44.63
64	9.58	24.34	24.78	132.3	6.22	11.46	64.93	5.32	1.21	80.35	61.59
65	7.37	13.19	13.65	123.46	3.46	10.75	46.95	2.99	1.76	82.87	44.42
66	9.19	17.6	18.05	115.21	4.54	10.09	49.4	3.97	1.70	81.87	53.26
67	9.48	22.33	22.78	117.54	5.72	10.28	60.34	4.99	1.37	81.45	59.93
68	7.51	11.48	11.94	116.81	3.02	10.22	40.21	2.64	1.97	83.22	42.99
70	7.01	10.76	11.22	121.92	2.85	10.63	40.66	2.47	1.95	83.29	41.17
71	8.66	15.79	16.24	126.3	4.09	10.98	47.23	3.53	1.74	81.56	49.34
73	7.27	12.23	12.69	116.66	3.21	10.21	44.15	2.80	1.86	83.44	43.51
74	8.02	13.25	13.71	113.67	3.46	9.97	43.14	3.03	1.90	83.00	46.05
76	7.83	13.63	14.09	114.74	3.56	10.06	45.47	3.12	1.82	83.08	46.18
78	7.26	12.04	12.50	125.87	3.17	10.95	43.66	2.73	1.85	82.79	42.77
79	8.54	16.76	17.21	121.5	4.34	10.6	50.82	3.76	1.65	81.99	50.77
81	9.6	20.64	21.09	114.31	5.29	10.02	55.1	4.63	1.53	81.57	58.04
84	8.22	15.19	15.65	97.34	3.95	8.66	48.05	3.54	1.79	83.97	49.90
85	7.18	11.16	11.62	107.65	2.94	9.49	40.95	2.60	1.98	84.16	42.65



86	11.13	29.35	29.79	127.18	7.43	11.05	66.76	6.40	1.16	79.37	71.46
87	10.2	21.12	21.57	133.6	5.4	11.56	52.94	4.61	1.56	79.74	57.99
88	8.83	18.66	19.11	140.91	4.81	12.15	54.47	4.06	1.50	80.39	52.25
89	8.52	15.13	15.59	125.08	3.93	10.88	46.13	3.39	1.78	81.76	48.41
90	8.97	18.72	19.17	122.36	4.82	10.66	53.73	4.18	1.56	81.57	53.89
91	11.62	29.01	29.45	131.44	7.33	11.39	63.08	6.27	1.26	78.67	71.20
93	10.08	24.82	25.26	147.87	6.33	12.71	62.8	5.29	1.24	78.86	61.69
96	7.32	12.95	13.41	122.87	3.4	10.71	46.45	2.94	1.77	82.95	44.09
99	10.78	23.46	23.91	120.04	5.97	10.48	55.38	5.19	1.51	80.15	63.14
100	8.98	19.55	20.00	127.71	5.03	11.09	56.01	4.33	1.48	81.19	54.61
101	10.36	26.77	27.21	134.2	6.81	11.61	65.73	5.81	1.18	79.56	66.01
102	8.35	16.19	16.64	129.7	4.2	11.25	50.3	3.60	1.64	81.59	49.20
103	9.78	20.35	20.80	115.23	5.22	10.09	53.37	4.57	1.58	81.35	57.85
104	7.51	11.24	11.70	136.3	2.96	11.78	39.41	2.52	1.95	81.84	41.58
105	8.05	13.47	13.93	135.7	3.52	11.73	43.73	2.99	1.82	81.42	45.01
106	8.27	15.23	15.69	121.06	3.96	10.56	47.88	3.44	1.74	82.26	48.45
108	8.88	20.6	21.05	140.2	5.3	12.09	59.68	4.48	1.35	80.40	54.89
109	8.91	17.28	17.73	128.9	4.46	11.19	50.06	3.83	1.65	81.16	51.44
110	10.36	25.75	26.19	122.08	6.56	10.64	63.32	5.69	1.27	80.38	65.70
111	9.08	19.48	19.93	112.52	5.01	9.88	55.18	4.40	1.54	82.15	55.81
113	9.86	23.54	23.99	146.1	6.02	12.56	61.05	5.05	1.30	79.17	59.83
114	13.02	37.32	37.75	118.22	9.35	10.33	71.81	8.15	1.03	78.32	86.92
115	12.33	34.68	35.11	125.62	8.72	10.93	70.72	7.52	1.05	78.43	81.14
116	8.93	19.78	20.23	155.67	5.09	13.33	57	4.21	1.39	79.28	52.74
117	11.74	31.51	31.95	115.23	7.95	10.09	67.72	6.96	1.15	79.64	76.71
118	10.3	25.59	26.03	110.33	6.52	9.7	63.3	5.74	1.29	81.23	66.43
119	12.31	32.55	32.98	121.47	8.19	10.59	66.53	7.11	1.18	78.73	78.36
120	8.49	17.25	17.70	120.93	4.46	10.55	52.53	3.87	1.60	82.08	51.34
121	9.33	18.48	18.93	115.48	4.76	10.11	51.02	4.16	1.65	81.73	54.64
122	8.24	14.58	15.04	115.1	3.8	10.08	46.12	3.33	1.80	82.71	47.99
123	9.8	20.78	21.23	144.35	5.32	12.42	54.29	4.47	1.50	79.34	56.14
124	11.37	28.84	29.28	107.76	7.3	9.5	64.2	6.45	1.27	80.45	72.98
125	9.75	22.05	22.50	155.04	5.64	13.28	57.85	4.67	1.37	78.65	56.91
127	13.17	39.45	39.88	114.35	9.87	10.02	74.94	8.65	0.94	78.44	90.86
128	9.48	18.86	19.31	103.44	4.85	9.15	51.16	4.31	1.68	82.42	56.26
129	8.71	14.46	14.92	135.34	3.76	11.7	43.17	3.20	1.84	80.89	47.13
130	10.24	23.14	23.59	137.61	5.91	11.88	57.71	5.02	1.41	79.43	60.54
131	7.46	12.39	12.85	126.97	3.25	11.03	43.57	2.80	1.85	82.55	43.39
133	9.18	19	19.45	123.84	4.89	10.78	53.27	4.23	1.57	81.28	54.48
134	9.6	23.2	23.65	132.96	5.94	11.51	61.88	5.07	1.30	80.29	60.06
137	8.31	13.53	13.99	130.34	3.53	11.3	42.48	3.03	1.87	81.58	45.76
138	8.88	16.74	17.19	156.82	4.33	13.42	48.76	3.58	1.63	79.24	48.79
139	8.8	16.06	16.51	123.22	4.16	10.73	47.27	3.60	1.75	81.65	50.12
141	9.5	18.79	19.24	132.5	4.83	11.48	50.84	4.13	1.62	80.40	53.99
142	9.19	18.1	18.55	129.7	4.66	11.25	50.71	4.00	1.63	80.87	52.85
143	9.46	18.78	19.23	142.98	4.83	12.31	51.06	4.07	1.59	79.72	53.16
144	9.05	15.43	15.89	117	4	10.24	44.2	3.49	1.85	81.86	50.05
145	9.14	19.01	19.46	115.08	4.89	10.08	53.5	4.28	1.58	81.92	55.08
146	9.24	19.86	20.31	132.8	5.11	11.5	55.3	4.36	1.49	80.61	55.06
147	9.53	22.23	22.68	130.21	5.69	11.29	59.71	4.88	1.37	80.54	58.83

148	7.73	13.62	14.08	133.57	3.56	11.56	46.05	3.04	1.76	81.84	44.86
149	11.89	30.7	31.14	148.93	7.75	12.79	65.18	6.47	1.17	77.28	72.29
150	11.1	25.68	26.12	130.25	6.52	11.3	58.74	5.59	1.39	79.19	65.85
151	10.28	21.07	21.52	123.35	5.39	10.74	52.43	4.66	1.59	80.36	58.87
152	9.41	20.49	20.94	123.6	5.26	10.76	55.9	4.55	1.49	81.10	56.84
153	8.32	16.79	17.24	133.34	4.35	11.54	52.28	3.71	1.58	81.36	49.65
154	10.52	23.15	23.60	127.85	5.9	11.1	56.08	5.07	1.48	79.85	61.71
155	9.06	17.67	18.12	127.77	4.56	11.1	50.33	3.92	1.65	81.11	52.27
156	10.19	22.23	22.68	129.87	5.68	11.27	55.74	4.87	1.48	79.99	59.82
157	9.55	17.95	18.40	135.28	4.62	11.7	48.38	3.93	1.69	80.17	52.73
158	12.41	32.87	33.30	157.97	8.27	13.51	66.64	6.82	1.12	76.25	75.09
159	7.63	12.26	12.72	101.57	3.22	9	42.2	2.87	1.96	84.20	45.04
160	7.6	13.77	14.23	101.06	3.6	8.96	47.37	3.21	1.80	84.26	46.87
161	8.16	14.86	15.32	106.44	3.87	9.39	47.43	3.43	1.78	83.38	48.79
162	9.59	21.93	22.38	119.56	5.62	10.44	58.6	4.89	1.42	81.22	59.41
163	7.14	9.15	9.61	114.03	2.44	10	34.17	2.14	2.16	83.74	39.96
164	9.17	17.14	17.59	114.65	4.42	10.05	48.2	3.87	1.74	81.92	52.62
165	10.17	23.84	24.28	120.14	6.08	10.49	59.78	5.28	1.38	80.67	62.85
166	10.08	19.68	20.13	116.38	5.04	10.19	50	4.40	1.68	81.00	57.17
167	9.63	20.54	20.99	125.15	5.27	10.89	54.72	4.55	1.52	80.80	57.12
168	7.09	11.31	11.77	123.45	2.98	10.75	42.03	2.58	1.90	83.12	41.79
169	10.23	23.37	23.82	134.08	5.96	11.6	58.26	5.08	1.40	79.68	61.09
170	13	36.85	37.28	125.25	9.23	10.9	71	7.97	1.04	77.88	85.30
171	11.47	26.57	27.01	157.53	6.73	13.48	58.67	5.55	1.34	77.05	65.07
172	20.26	23.93	24.37	143.66	5.86	12.37	28.92	4.93	2.23	70.58	67.14
173	10.56	25.15	25.59	140.7	6.4	12.13	60.61	5.41	1.32	78.95	63.46
174	9.81	20.29	20.74	119.2	5.2	10.41	53.01	4.53	1.59	81.05	57.47
175	10.16	22.78	23.23	144.38	5.82	12.43	57.28	4.89	1.41	79.03	59.35
176	9.83	21.62	22.07	135.2	5.53	11.69	56.26	4.71	1.46	79.94	58.04
177	8.65	18.43	18.88	124.42	4.76	10.83	55.03	4.11	1.52	81.70	52.89
178	9.92	21.48	21.93	114.98	5.5	10.07	55.44	4.81	1.52	81.25	59.64
179	10.76	24.99	25.43	135.43	6.36	11.71	59.11	5.41	1.37	79.13	63.99
180	11.54	29.91	30.35	126.45	7.56	10.99	65.51	6.51	1.20	79.07	72.93
181	11.93	31.85	32.29	121.36	8.03	10.58	67.31	6.97	1.16	79.07	76.85
182	9.23	20.79	21.24	119.58	5.34	10.44	57.85	4.65	1.44	81.53	57.29
183	7.19	11.6	12.06	115.27	3.06	10.1	42.56	2.68	1.91	83.61	42.78
184	8.7	17.97	18.42	109.88	4.64	9.67	53.33	4.09	1.60	82.66	53.41
185	10.92	27.66	28.10	126.57	7.02	11	64.29	6.05	1.24	79.59	68.81
186	12.7	33.38	33.81	135.83	8.38	11.74	65.98	7.13	1.17	77.46	78.51
187	10.87	26.63	27.07	160.78	6.76	13.74	62.19	5.55	1.24	77.33	64.11
189	9.21	18.9	19.35	104.73	4.86	9.25	52.77	4.31	1.63	82.57	55.80
190	12.39	30.09	30.53	133.9	7.58	11.59	61.18	6.46	1.32	77.84	73.49
192	11.62	31.18	31.62	127.2	7.87	11.05	67.73	6.77	1.13	78.95	74.80
193	12.74	34.34	34.77	122.82	8.62	10.7	67.66	7.47	1.14	78.27	81.46
194	12.64	33.13	33.56	123.67	8.32	10.77	65.82	7.20	1.20	78.30	79.39
195	12.57	34.38	34.81	147.47	8.64	12.67	68.74	7.23	1.07	76.81	78.61
197	7.85	14.54	15.00	117.77	3.79	10.3	48.28	3.30	1.73	82.86	47.15
198	10.68	25.6	26.04	108.38	6.51	9.55	60.96	5.75	1.37	81.02	67.16
199	19.51	25.42	25.86	117.84	6.24	10.3	31.98	5.44	2.22	72.69	71.91
200	10.06	22.03	22.48	143.42	5.63	12.35	55.96	4.74	1.45	79.18	58.26

201	10.25	23.23	23.68	146.88	5.93	12.63	57.85	4.97	1.39	78.78	59.88
202	12.43	36.35	36.78	129.92	9.13	11.27	73.45	7.83	0.96	78.07	83.29
203	10.67	26.66	27.10	114.34	6.78	10.02	63.54	5.94	1.28	80.63	68.18
204	9.02	18.67	19.12	128.22	4.81	11.13	53.33	4.13	1.56	81.12	53.49
205	11.71	31.91	32.35	128.44	8.05	11.15	68.74	6.92	1.10	78.79	75.88
206	9.21	20.68	21.13	114.67	5.31	10.05	57.65	4.65	1.46	81.89	57.48
207	9.45	22.87	23.32	137.11	5.86	11.84	62.01	4.98	1.29	80.14	59.04
208	9.3	16.37	16.82	111.15	4.23	9.77	45.48	3.72	1.83	82.05	52.03
209	12.45	33.31	33.74	145.82	8.38	12.54	67.31	7.03	1.12	77.02	77.09
211	9.93	22.38	22.83	123.26	5.72	10.74	57.6	4.95	1.44	80.67	60.20
212	11.05	25.99	26.43	147.62	6.6	12.69	59.73	5.52	1.33	78.06	64.67
213	11.75	29.5	29.94	144.72	7.45	12.45	63.4	6.26	1.23	77.68	70.78
214	12.1	27.83	28.27	130.43	7.03	11.31	58.1	6.02	1.41	78.32	70.18
215	11.06	27.16	27.60	145.08	6.89	12.48	62.3	5.79	1.26	78.23	66.55
216	9.09	16.02	16.47	127.75	4.14	11.1	45.54	3.56	1.79	81.08	50.10
217	9.28	19.68	20.13	119.03	5.06	10.4	54.53	4.40	1.54	81.52	55.91
218	11.49	27.13	27.57	115.56	6.87	10.12	59.79	6.01	1.39	79.83	69.83
219	11.54	29.42	29.86	111.18	7.44	9.77	64.47	6.55	1.26	80.08	73.74
221	11.63	28.73	29.17	121.19	7.26	10.57	62.42	6.30	1.30	79.34	71.81
223	10.69	26.18	26.62	114.48	6.65	10.03	62.21	5.83	1.32	80.61	67.44
224	8.97	18.93	19.38	136.16	4.88	11.77	54.4	4.15	1.51	80.60	53.18
226	10.39	25.12	25.56	119.77	6.4	10.46	61.6	5.57	1.33	80.51	65.04
227	10.91	20.29	20.74	144.12	5.18	12.41	47.48	4.36	1.69	78.42	56.80
PI-B1	7.32	13.59	14.05	111.5	3.56	9.8	48.63	3.13	1.74	83.76	45.53
PI-B2	9.95	23.55	24.00	112.61	6.02	9.88	60.5	5.29	1.38	81.38	62.81
PI-B3	11.26	28.13	28.57	107.4	7.13	9.47	63.32	6.31	1.30	80.57	71.82
PI-B4	10.85	26.25	26.69	113.08	6.67	9.92	61.47	5.85	1.35	80.56	67.94
PI-B5	10.45	25.11	25.55	103.93	6.39	9.19	61.15	5.68	1.37	81.52	66.50
PI-B6	10.36	24.18	24.62	117.97	6.16	10.31	59.46	5.37	1.40	80.66	63.79
PII-B1	11.12	30.59	31.03	120.55	7.74	10.52	69.6	6.72	1.09	79.82	73.91
PII-B2	10.47	25.41	25.85	114.39	6.47	10.03	61.8	5.67	1.33	80.80	66.05
PII-B4	10.56	24.91	25.35	120.07	6.34	10.48	60.04	5.51	1.37	80.34	64.94
PII-B5	10.95	27.28	27.72	113.27	6.92	9.94	63.2	6.07	1.29	80.45	69.53
PII-B6	11.87	31.37	31.81	118.87	7.91	10.39	66.64	6.89	1.18	79.28	76.28
GI-B1	9.68	22.3	22.75	113.6	5.71	9.96	58.99	5.01	1.42	81.55	60.55
GI-B2	10.62	25.52	25.96	110.92	6.49	9.75	61.11	5.71	1.36	80.90	66.72
GI-B3	11.1	27.79	28.23	118.1	7.04	10.32	63.42	6.14	1.28	80.00	70.02
GI-B4	11.56	29.07	29.51	111.92	7.35	9.83	63.58	6.46	1.28	80.01	73.16
GI-B5	10.92	26.24	26.68	106.12	6.66	9.37	60.99	5.90	1.37	80.96	68.62
GI-B6	12.36	32.89	33.32	113.43	8.27	9.95	66.91	7.25	1.18	79.21	79.79
GII-B1	7.47	13	13.46	145.27	3.41	12.5	45.65	2.86	1.74	81.23	43.04
GII-B2	6.67	10.85	11.31	133.2	2.87	11.53	43.03	2.45	1.85	82.78	40.07
GII-B3	7.22	11.97	12.43	149.58	3.15	12.84	43.63	2.63	1.79	81.13	41.24
GII-B4	7.27	13.77	14.23	150.78	3.6	12.94	49.52	3.00	1.62	81.00	43.22
GII-B5	7.79	14.58	15.04	147.37	3.8	12.67	48.78	3.18	1.65	80.81	45.21
GII-B6	9.16	18.96	19.41	141.74	4.88	12.22	53.28	4.12	1.53	80.05	53.06

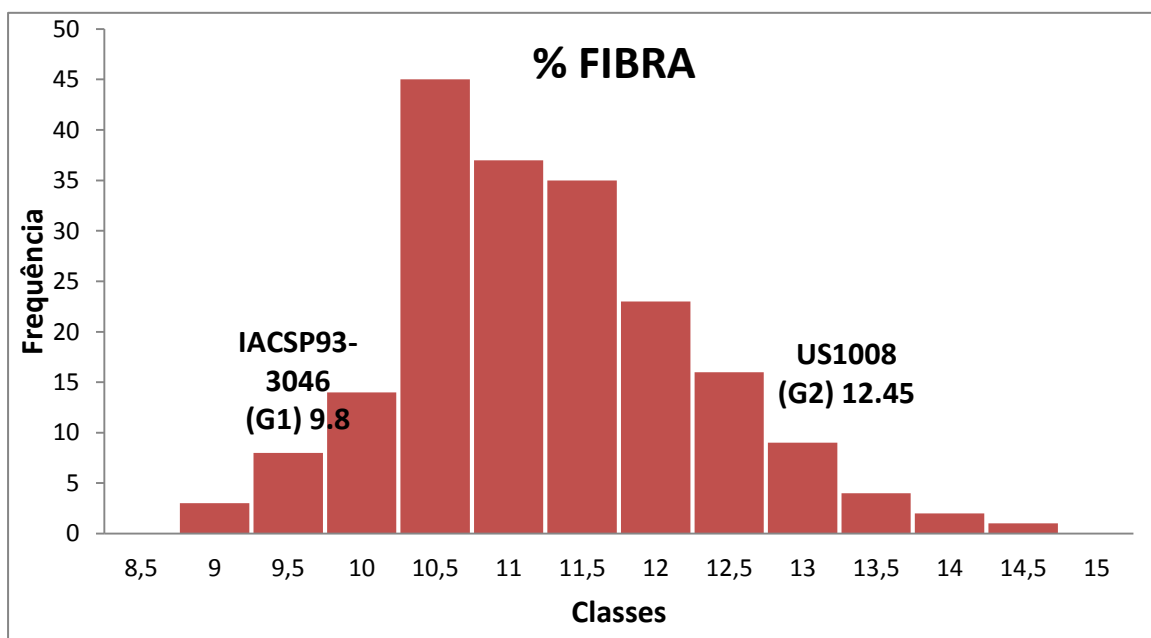
Genitor 1 - GI: IACSP933046

Genitor 2 - GII: US851008

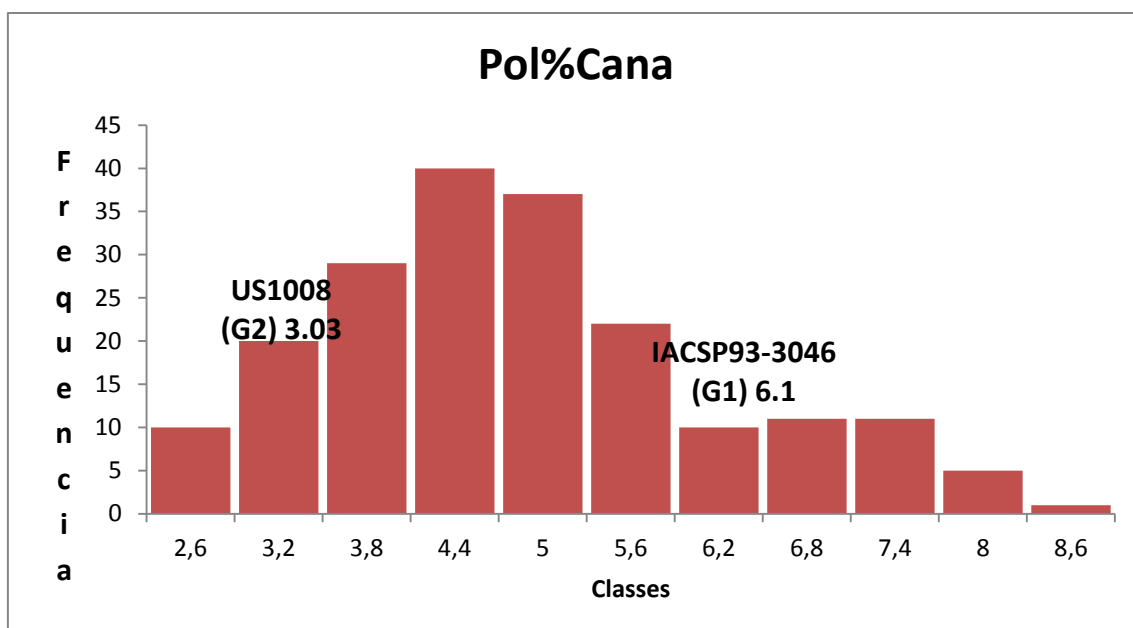
Genótipo Provado 1 - PI: IACSP955000

Genótipo Provado 2 - PII: IACSP955094

Numa análise inicial, os genitores apresentaram resultados contrastantes para ambas as características (fibra e açúcar), ocorrendo indivíduos transgressivos da mesma forma. A diversidade molecular comprovada no presente trabalho, para os três grupos de cana (acessos, cultivares tradicionais e cultivares modernas), combinada com variação significativa das características de fibra e açúcar observada nessa progênie, comprova que a mesma é adequada para verificação de QTL para essa característica em futuros estudos genéticos.



**Fig. A** Distribuição de frequência em classes. Análise parcial da progênie do cruzamento de genótipos contrastantes para os teores de Fibra.



**Fig. B** Distribuição de frequência em classes. Análise parcial da progênie do cruzamento de genótipos contrastantes para % POL Cana (teores de açúcar).