

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E MELHORAMENTO**

RODRIGO DESORDI

**Identidade genética em locos de SSR e EST-SSR na cultivar
RB92579 de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) cultivada nos estados do
Paraná e Mato Grosso do Sul**

**MARINGÁ
PARANÁ – BRASIL
DEZEMBRO – 2015**

RODRIGO DESORDI

**Identidade genética em locos de SSR e EST-SSR na cultivar
RB92579 de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) cultivada nos estados do
Paraná e Mato Grosso do Sul**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Maringá, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do Título de Mestre.

Orientadora: Prof^a Dr^a Claudete Aparecida Mangolin.

MARINGÁ
PARANÁ – BRASIL
DEZEMBRO – 2015

Aos meus pais, Sérgio Dezordi (*in memoriam*) e Nilci Borchardt Desordi, por terem me dado a vida, o caráter e os valiosíssimos conselhos e exemplos que me fizeram crescer.

Aos meus irmãos, Marcos Antonio Desordi e Simone Cristina Desordi, pela amizade, companheirismo e incentivo.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por mais esta graça alcançada.

À Universidade Estadual de Maringá (UEM) e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento (PGM), pela oportunidade.

À professora doutora Claudete Aparecida Mangolin, pela oportunidade, confiança, ensinamentos e pela valiosa orientação na elaboração deste trabalho.

À professora doutora Maria de Fátima Pires da Silva Machado, pela amizade, colaboração e ensinamentos.

A todos os professores Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento e do Departamento de Biologia Celular e Genética, pela amizade e conhecimentos repassados durante esse período.

Aos Técnicos de Laboratório, Sérgio e Leila, pelo auxílio constante, bem como ao Francisco e à Maria Valquíria, secretários do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, pelo empenho em me ajudar.

Ao Ítalo Fassima, da Usina Santa Terezinha, e ao Alexandre Schoen, da Usina Adecoagro, por permitir e auxiliar nas coletas de material biológico.

Ao “companheiro de campanha”, Gustavo Barizon Maranhão, pela troca de informações e pelo auxílio na condução deste trabalho durante as coletas, extrações e reações.

A todos os colegas do Laboratório de Cultura de Tecidos e Eletroforese de Vegetais (LCTVE) pela amizade e apoio. Meu muito obrigado!

A todos os colegas de trabalho na Monsanto, pela amizade, troca de experiências e pela compreensão nos momentos de ausência às minhas atividades durante a realização deste trabalho.

À minha família, pelo apoio, atenção, carinho e por sempre me amparar nas horas difíceis e decisivas da vida.

Àqueles que, embora não mencionados, sabem de sua importância na minha e trajetória de vida.

BIOGRAFIA

RODRIGO DESORDI, filho de Sergio Dezordi e de Nilci Borchardt Desordi, nasceu no município de São João, Paraná, no dia 07 de agosto de 1989.

Finalizou o Ensino Fundamental, na Escola Municipal Coraci Meireles de Oliveira, na cidade de Paracatu – MG, no ano de 2004. No ano seguinte, ingressou na Escola Agrotécnica Federal de Uberlândia, em Uberlândia – MG, onde realizou o curso Técnico em Agropecuária, paralelo ao Ensino Médio, concluindo os dois cursos em 2006.

Em 2008, iniciou o curso de Engenharia Agrônoma, na Universidade Federal de Viçosa, Campus Rio Paranaíba - MG, concluindo-o em 2012, com a Monografia intitulada “Dissimilaridade genética e avaliação de cultivares de trigo (*Triticum aestivum* L.) na região do Alto Paranaíba – MG”.

Em 2013, ingressou no curso de Especialização em Biotecnologia pela Universidade Estadual de Maringá, em Maringá-PR, concluindo-o em 2014, com a Monografia “Comparação de métodos de extração de DNA genômico de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.)”.

Em fevereiro de 2014, iniciou o curso de Mestrado no Programa de Genética e Melhoramento (PGM) da Universidade Estadual de Maringá (UEM), onde desenvolveu trabalhos com marcadores moleculares no estudo da diversidade genética da cana-de-açúcar.

SUMÁRIO

RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	ix
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1. Origem e disseminação da cana-de-açúcar.....	4
2.2. Importância econômica da cana-de-açúcar	4
2.3. Caracterização das regiões de cultivo da cana-de-açúcar.....	6
2.4. Taxonomia da cana-de-açúcar.....	8
2.5. A cultivar RB92579	11
2.6. Proteção de cultivares no Brasil.....	13
2.7. Marcadores microssatélites em cana-de-açúcar.....	14
2.8. Marcadores EST-SSR em cana-de-açúcar	17
3. MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1. Locais de coleta do material biológico	20
3.2. Coleta das amostras	20
3.3. Extração e quantificação do DNA	21
3.4. Amplificação do DNA	22
3.5. Análise estatística dos dados.....	24
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
5. CONCLUSÕES	34
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	35

RESUMO

DESORDI, Rodrigo, M. Sc. Universidade Estadual de Maringá, dezembro de 2015. **Identidade genética em locos de SSR e EST-SSR na cultivar RB92579 de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) cultivada nos estados do Paraná e Mato Grosso do Sul.** Orientadora: Claudete Aparecida Mangolin. Coorientadora: Maria de Fátima Pires da Silva Machado.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar 92 amostras de cana-de-açúcar quanto à sua uniformidade genética, em quatro locos de SSR e oito locos de EST-SSR na cultivar RB92579, coletadas nos estados do Paraná-PR e Mato Grosso do Sul-MS. Destes, seis locos (*EstC80*, *Smc226CG*, *EstC69*, *EstB58*, *mSSCIR52* e *EstC45*) apresentaram polimorfismo enquanto os outros seis locos (*Smc2007*, *EstC119*, *EstC84*, *Smc477CG*, *EstC113* e *EstB149*) foram monomórficos. Portanto, a proporção de locos polimórficos foi de 50%. Os locos monomórficos podem ser recomendados para *fingerprint* da cultivar RB92579 como ferramenta auxiliar nos processos de identificação varietal tradicionais. Para os 12 locos, foram encontrados 25 alelos com uma média de 2,08 alelos por loco analisado. O número de alelos em sequências simples repetidas que são expressas (EST-SSR) foi menor (2,0 alelos por loco) que o número de alelos em sequências simples repetidas de locos não expressos (2,25 alelos por loco). Os valores de heterozigosidade esperada (H_e) e do índice informativo de Shannon (I) foram discretamente maiores para as amostras de RB92579 cultivadas no Paraná ($H_e = 0,098$ e $I = 0,1455$) do que para as amostras cultivadas no Mato Grosso do Sul ($H_e = 0,086$ e $I = 0,1327$). A análise de variância molecular mostrou que a maior porcentagem de variação genética (96%) está dentro das amostras das duas localidades, enquanto que, entre as amostras de Mandaguaçu-PR e Angélica-MS, a variância molecular foi de apenas 4%. A análise da estrutura genética mostrou que a cultivar RB92579 é formada por um conjunto de plantas que contém alelos de três grupos ancestrais ($K = 3$) nos locos analisados. Observa-se pouca mistura de alelos; 80,44% das plantas avaliadas tem mais de 90% de somente um dos três genomas e somente 19,56% das plantas apresentam mistura em diferentes proporções de dois ou três genomas ancestrais. O loco *EstC69*, que supostamente codifica para a enzima celulose sintase-6, possui 2 alelos; o índice informativo de Shannon (I) para este loco foi de 0,5850, a

heterozigosidade esperada (H_e) foi de 0,3958 e a heterozigosidade observada (H_o) foi de 0,5435. O F_{IS} para este loco foi de -0,4145, indicando um excesso de heterozigotos. A identidade genética entre as amostras de cana-de-açúcar dos dois locais de coleta foi de 0,997, indicando altíssima similaridade genética. Pode-se inferir que os procedimentos realizados pela indústria sucroalcooleira podem ser os mesmos para as amostras da cultivar RB92579 provenientes de Mandaguaçu-PR e de Angélica-MS.

Palavras-chave: uniformidade genética, *fingerprint*, genomas ancestrais, cana-de-açúcar.

ABSTRACT

DESORDI, Rodrigo, M. Sc. Universidade Estadual de Maringá, December 2015. **Genetic identity in loci *SSR* and *EST-SSR* for cultivar RB92579 of sugarcane (*Saccharum* spp.) cultivated in Paraná and Mato Grosso do Sul states.** Adviser: Claudete Aparecida Mangolin. Committee Member: Maria de Fatima Pires da Silva Machado.

The objective of this study was to evaluate 92 samples of sugarcane about their genetic uniformity in four loci *SSR* and eight loci *EST-SSR* in the variety RB92579, collected in Paraná and Mato Grosso do Sul state. These six loci (*EstC80*, *Smc226CG*, *EstC69*, *EstB58*, *mSSCIR52* and *EstC45*) presented polymorphism while the other six loci (*Smc2007*, *EstC119*, *EstC84*, *Smc477CG*, *EstC113* and *EstB149*) were monomorphic; therefore the proportion of polymorphic loci was 50%. Monomorphic loci can be recommended for fingerprint cultivar RB92579 as an auxiliary tool to the traditional varietal identification processes. For the 12 loci, 25 alleles were found with an average of 2.08 alleles per locus analyzed. The number of alleles at single repeated sequences which are expressed (*EST-SSR*) was lower (2.0 alleles per locus) than the number of alleles at loci single repeated sequences which are not expressed (2.25 alleles per locus). The expected heterozygosity values (H_e) and Shannon information index (I) were slightly higher for samples of RB92579 grown in Paraná ($H_e = 0.098$ and $I = 0.1455$), than the samples grown in Mato Grosso do Sul ($H_e = 0.086$ and $I = 0.1327$). The molecular variance analysis showed that the highest percentage of genetic variation (96%) is within the samples of the two populations, while among these samples of Mandaguaçu-PR and Angelica-MS the molecular variance was only 4%. The analysis of the genetic structure showed that the variety RB92579 is formed by a set of plants containing ancestral alleles of three groups ($K = 3$) in the analyzed loci. It was observed little mixing of alleles, 80.44% of the evaluated plants have more than 90% of only one of the three ancestral genomes; only 19.56% of the plants have mixing in different proportions two or three ancestral genomes. The *EstC69* loci, which encodes the cellulose synthase-6 enzyme, has two alleles. The Shannon information index (I) for this locus was 0.5850, the expected heterozygosity (H_e) was 0.3958, and observed heterozygosity (H_o) was 0.5435. The F_{IS} for this locus was -0.4145, indicating an excess of heterozygotes. The genetic identity between samples of sugarcane of the

two collection places calculated for the 12 loci was 0.997, indicating high genetic similarity, so it can be inferred that the procedures carried out by the sugar industry may be the same for RB92579 variety of samples from Mandaguaçu-PR and Angelica-MS.

Keywords: genetic uniformity, *fingerprint*, ancestral genomes, sugar cane

1. INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) tem seu centro de origem no Sudeste Asiático e, por meio do processo de domesticação e disseminação, chegou ao Brasil por volta do ano de 1510. O potencial de produção e o papel fundamental da cana-de-açúcar e de seus subprodutos fazem dessa cultura uma das mais importantes atividades da agroindústria nacional (CIB, 2015).

A cana-de-açúcar é uma planta perene na sua forma natural, mas semiperene no cultivo extensivo. É necessário um novo plantio, realizado geralmente entre a quinta e a sétima colheita. Isso ocorre porque o pisoteio por máquinas e veículos no cultivo e, principalmente, na colheita, não apenas prejudica diretamente a planta, como também compacta o solo. Além disso, há um progressivo acúmulo de doenças no canavial. Consequentemente, com o avanço dos ciclos, ocorre uma diminuição natural do número de plantas e o crescimento reduzido das remanescentes, ocasionando queda de produção, que atinge níveis economicamente inviáveis, exigindo a substituição por novo plantio (CIB, 2015).

Mesmo reformando os canaviais, historicamente, as diferentes cultivares de cana-de-açúcar, depois de alguns anos de cultivo contínuo, se degeneram, por causas ainda desconhecidas, motivando sua substituição por outros cultivares, comprovadamente mais produtivos, fato que vem acontecendo em todos os países produtores. Nesse contexto, o melhoramento dessa cultura assume uma grande importância para substituições dessas cultivares (Cesnik e Miocque, 2004), fazendo-se necessário uma investigação para encontrar evidências genéticas que expliquem essa degeneração.

O conhecimento da diversidade genética entre cultivares comerciais em programas de melhoramento de plantas é de fundamental importância para os melhoristas na identificação e na organização dos recursos genéticos disponíveis, visando à utilização desses na produção de novas cultivares promissoras (Palomino et al., 2005). Diversidade genética alta é importante para os programas de melhoramento, enquanto a uniformidade genética é desejável para o setor industrial (Maranho, 2015).

A escolha de genitores e o planejamento de cruzamentos em programas de melhoramento genético são etapas iniciais e fundamentais para o sucesso do

programa (Borém, 1997). Dados sobre a diversidade genética de potenciais genitores obtidos com base em marcadores moleculares podem auxiliar na escolha dos genitores e no planejamento dos cruzamentos, visando à maximização da heterose e das combinações gênicas desejadas (Faleiro, 2007).

Quando um canavial está plantado com diversas cultivares misturadas aleatoriamente é praticamente impossível atingir os requisitos de homogeneidade de qualidade tecnológica da matéria-prima, porque cada cultivar apresenta um comportamento específico de maturação e níveis diferentes de sacarose. A eliminação de possíveis misturas reflete na pureza varietal que proporcionará maior uniformidade na maturação da cana-de-açúcar e conseqüentemente melhor qualidade industrial (Miller, 2015). Diversidade genética alta, desde que esteja associada aos genes responsáveis pela produção de enzimas relacionadas à produção e metabolismo do açúcar, também pode interferir na maturação do canavial e conseqüentemente em sua qualidade industrial.

Para investigar a diversidade genética em cana-de-açúcar, os programas de melhoramento têm adotado um diagnóstico molecular, que é obtido com o emprego de marcadores moleculares. Entre os marcadores, as sequências simples repetidas de DNA (*Simple Sequence Repeats* - SSRs) também conhecidos como microssatélites apresentam grande valor no estudo de muitas espécies de plantas. Esta ampla aplicação é atribuída à sua natureza multialélica, herança codominante, facilidade de detecção dos resultados pela PCR (*Polymerase Chain Reaction*), abundância relativa, cobertura extensiva do genoma e necessidade de pequenas quantidades de DNA para dar início às PCR (Powell et al., 1996; Oliveira, 2006). Os microssatélites têm sido utilizados para estudar divergência genética em cana-de-açúcar (Cordeiro et al., 2000; 2001; Pan et al., 2003; Pinto et al., 2004; Maranhão, 2012; Augusto, 2013; Maranhão, 2015; Augusto et al., 2015). Estes marcadores também têm sido associados com o conteúdo de açúcar (Singh et al., 2008) e doenças em cana-de-açúcar, como a Podridão Radicular (*Pachymetra chaunorhiza*), escaldadura das folhas (*Xanthomonas albilineans*), Doença de Fiji (*Fiji disease virus*) e Carvão (*Ustilago scitaminea*) (Wei et al., 2006).

A análise de SSRs localizadas em sequências transcritas no genoma, desenvolvidas a partir de etiquetas de sequências expressas (*Expressed Sequence Tags* - EST), também têm sido consideradas de interesse em cana-de-açúcar porque permitem uma associação direta entre os genes e as características de

interesse agrônomo. A análise de ESTs tem sido considerada uma estratégia simples para o estudo da porção expressa do genoma, mesmo em organismos com genomas grandes, complexos e altamente redundantes como a cana-de-açúcar (Sterky e Lundeberg, 2000).

Embora a diversidade dentro de cultivares de cana-de-açúcar seja um tema pouco explorado (Maranho, 2012), há indicativos de que determinadas cultivares apresentam um nível alto de heterozigosidade e uma divergência genética alta entre amostras cultivadas em regiões edafoclimáticas distintas (Augusto, 2013).

Pelo censo varietal da Rede Inter universitária para o Desenvolvimento do setor Sucroenergético (RIDESA), realizado em 2015, a cultivar RB92579 ocupou a 11ª posição em área de cultivo no estado do Paraná, com 11.252 ha e foi a 5ª mais cultivada nos estados de São Paulo e Mato Grosso do Sul, com aproximadamente 197.781 ha (Oliveira et al., 2015). Essa cultivar se destaca por sua excelente produtividade agrícola, florescimento muito baixo e responsividade à irrigação, sendo muito eficiente no uso da água. A caracterização da diversidade ou identidade genética para os locos SSR e EST-SSR nesta cultivar é uma informação de interesse para os programas de melhoramento e para o setor industrial, respectivamente.

Diante do exposto acima, a proposta do presente estudo foi investigar a identidade genética em locos SSR e EST-SSR para a cultivar de cana-de-açúcar RB92579, cultivada em duas diferentes regiões edafoclimáticas (Paraná e Mato Grosso do Sul).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Origem e disseminação da cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar é uma planta herbácea, alógama, pertencente à família das gramíneas (Poaceae), tribo Andropogonae e gênero *Saccharum*, como descrito em Matsuoka et al. (2005). É nativa das regiões tropicais, cujo cultivo se estende, atualmente, aos dois hemisférios. As espécies que deram origem às cultivares atuais de cana-de-açúcar são oriundas do Sudeste Asiático. A origem da espécie *Saccharum officinarum*, por exemplo, está intimamente associada à atividade humana, pois ela tem sido cultivada desde a pré-história. Acredita-se que o centro de origem de *S. Officinarum* seja a Melanésia (Oceania), onde ela foi domesticada e depois disseminada pelo homem por todo o Sudeste Asiático. A região tornou-se centro de diversidade, tendo como núcleo Papua Nova Guiné e Java (Indonésia), regiões onde a maior parte das espécies foi coletada a partir do final de 1800 (CIB, 2015).

As expedições ao Ocidente no Século VIII ajudaram a disseminar a cana-de-açúcar por todo o território conquistado, principalmente naquelas regiões próximas das margens do Mar Mediterrâneo. Com as expedições dos portugueses e espanhóis ao Oriente, fazendo a histórica rota denominada “Caminho das Índias”, Cristóvão Colombo, em 1493, na sua segunda expedição por essa rota, teria trazido feixes de cana-de-açúcar para dentro de suas caravelas (Mc Martin, 1971).

No Brasil, as primeiras mudas de cana-de-açúcar foram introduzidas em 1510, trazidas da Ilha da Madeira (Portugal), por Martim Afonso de Souza (Cesnik e Miocque, 2004). O primeiro engenho de açúcar foi construído em 1532, na capitania de São Vicente (na região Sudeste). Mas foi no Nordeste, especialmente nas Capitanias de Pernambuco e da Bahia, que os engenhos de açúcar se multiplicaram. No século seguinte, já éramos o maior produtor e fornecedor mundial de açúcar, posição mantida até o final do século XVII.

2.2. Importância econômica da cana-de-açúcar

Historicamente, a cana-de-açúcar sempre foi um dos principais produtos agrícolas do Brasil e atualmente o País é o maior produtor mundial desta cultura

(CIB, 2015). A área cultivada com cana-de-açúcar na safra 2014/15 foi estimada em aproximadamente 9 milhões de hectares, distribuídos em todos os estados produtores. O estado de São Paulo permanece como o maior produtor, com 52% (4,7 milhões de hectares) da área plantada; seguido por Goiás, com 9,5% (854,2 mil hectares); Minas Gerais, com 8,8% (800,9 mil hectares); Mato Grosso do Sul, com 7,4% (668,3 mil hectares); Paraná com 7,1% (635,0 mil hectares), Alagoas, com 4,3% (385,3 mil hectares); e Pernambuco, com 2,9% (260,1 mil hectares). Estes sete estados são responsáveis por 92,1% da produção nacional. Os demais estados produtores possuem áreas menores, com representações abaixo de 3% (CONAB, 2015).

A produção total de cana-de-açúcar destinada à indústria, estimada para a safra 2015/16, é de 654,6 milhões de toneladas, com acréscimo de 3,1% (19,8 milhões de toneladas) em relação à safra 2014/15, que foi de 634,8 milhões de toneladas (CONAB, 2015). Na safra 2013/14, o PIB do setor sucroenergético somou U\$ 43,36 bilhões, o que representa 2% do PIB nacional. O aumento da demanda de cana-de-açúcar implicará um investimento no valor de R\$ 97 bilhões até 2020, para suprir o aumento do consumo interno de 170%, junto com o aumento de exportação do álcool combustível para países como Estados Unidos da América, Japão, Jamaica e outras nações que compram o etanol do Brasil (EPE, 2015).

O setor emprega diretamente 613 mil pessoas, atingindo 988 mil, se considerados os empregos sazonais gerados no pico da colheita e pode chegar a 3,6 milhões se considerados também os indiretos e informais (Neves e Trombin, 2014).

Esta cultura também tem um papel ambiental muito importante, uma vez que o etanol, um dos subprodutos da cana-de-açúcar, é uma das melhores alternativas para reduzir a emissão de gases causadores do efeito estufa, haja vista a sua queima como combustível reduzir em 70% a emissão de CO₂ na atmosfera em relação à gasolina (CONAB, 2015). Além disso, o bagaço e a palhada da cana-de-açúcar podem ser usados como fonte de energia elétrica ou para produzir o etanol de segunda geração (Martin et al., 2002; Hernández-Salas et al., 2009). Subprodutos, como a vinhaça e a torta de filtro, podem ser usadas como fertilizantes. Desta forma, a cana-de-açúcar pode ser considerada um símbolo de energia renovável para o país (Lee e Bressan, 2006); renovável porque a emissão

de gás carbônico oriundo de processos de combustão é compensada pelo carbono sequestrado no cultivo da próxima safra e assim sucessivamente.

2.3. Caracterização das regiões de cultivo da cana-de-açúcar

Atualmente, a cana-de-açúcar é cultivada em todas as regiões tropicais e subtropicais do mundo, em ambos os hemisférios, até cerca de 35° N e 35° S. Os principais países produtores são o Brasil (46% da produção mundial), Índia (24%), China (6%), Paquistão (5%), Tailândia (5%), México (3,5%), Austrália (2%), Cuba (2%), Colômbia (2%) e África do Sul (2%), (FAOSTAT, 2015).

No Brasil, a Região Nordeste (antiga Zona da Mata) ocupou a ponta da produção até o século XIX. Já no século XX, a Região Sudeste passou a ser a principal produtora e, no final do século XX, o Estado de São Paulo despontou na produção ficando consolidado como o maior produtor. A partir daí, o cultivo de cana ocupou outras áreas não tradicionais, como: Triângulo Mineiro, Noroeste do Paraná, Centro-Sul-Leste do Mato Grosso do Sul e Centro-Sul-Sudeste de Goiás (Domingues e Thomaz-Junior, 2012). Na safra 2015/2016, os estados do Paraná e Mato Grosso do Sul operaram com 30 e 24 usinas, respectivamente (NOVACANA, 2015).

No Paraná o cultivo da cana-de-açúcar está localizado nas regiões Norte e Noroeste do Estado (Zambon, 2000). Estas regiões possuem como característica marcante temperaturas médias anuais entre 20 a 25 °C e médias inferiores a 16 °C (SIMEPAR, 2015) nos meses mais frios (junho, julho e agosto). Nesse período ocorrem, em média, cinco geadas. A precipitação pluvial média anual da região canavieira paranaense está compreendida entre 1.200 mm a 1.800 mm, podendo ser um pouco menor nas regiões mais ao extremo nordeste e extremo noroeste do Estado (IAPAR, 2015). Nas regiões canavieiras paranaenses (norte-noroeste) existe o predomínio dos solos classificados como Latossolos; Terra Roxa Estruturada (Nitossolo) em áreas de ocorrência de basalto e Argissolos nas áreas de predomínio do arenito (Antoneli, 2003). Em sua generalidade, os solos são derivados do basalto (mais a nordeste do estado) e do arenito (deslocando-se para noroeste) (Embrapa, 1999; Prado, 2005).

No Mato Grosso do Sul, a maior concentração das unidades agroprocessadoras está na região Centro Sul, mas há também algumas outras

unidades espalhadas pelo restante do estado, com exceção da região pantaneira, que é protegida por lei (ZAEcana, 2015). Estas regiões possuem temperaturas médias anuais dos meses mais frios e mais quentes, oscilando, respectivamente, entre 15°C a 19°C e entre 23°C a 26° C. Durante o ano, a temperatura média ambiental é alta nos meses de janeiro a março, com início de queda em abril, atingindo os menores valores em junho, julho e agosto (IMAP MS, 2006). Segundo dados da Fundação MS, para a região Centro Sul do Mato Grosso do Sul, entre os anos de 1993 a 2011, foram registradas 58 geadas, com média de três geadas por ano, tendo destaque o ano de 2000 que registrou 10 eventos (Lourenção, 2015). A precipitação média anual varia de 1.400 a 1.700 milímetros, sendo novembro, dezembro e janeiro o trimestre mais chuvoso (IMAP MS, 2006).

Os solos da região agrícola do Mato Grosso do Sul são, em sua maioria, classificados como Latossolo Roxo (46,2%) e Latossolo Vermelho-Escuro (38,5%). O Latossolo Roxo, predominantemente originado do basalto, tem textura argilosa e boas características físicas e topográficas, além de um potencial nutricional relativamente bom. O Latossolo Vermelho-Escuro tem fertilidade muito variada e de textura que vai de franco arenosa a muito argilosa (Oliveira et al., 2000).

O conjunto de características químicas, físicas e morfológicas do solo, juntamente com as condições climáticas do local, define o tipo de Ambiente de produção da cana-de-açúcar. São classificados pelas letras de A a E, levando em consideração fatores como a profundidade, que é diretamente relacionada com a disponibilidade de água no solo e o volume a ser explorado pelas raízes; a fertilidade, ou seja, a fonte de nutrientes para as plantas; a textura, relacionada a trocas catiônicas e quantidade de matéria orgânica; e a disponibilidade hídrica, responsável pela parte solúvel do solo (Santos, 2012). Normalmente, o ambiente A é classificado como solos argilosos, bem drenados e eutróficos, com maior potencial produtivo, atingindo produtividades superiores a 100 Toneladas de Cana por Hectare (TCH). Na medida em que os ambientes vão mudando para B, C e D, os fatores limitantes à produção vão aumentando até chegar a E, que representa um Ambiente arenoso, com baixa disponibilidade de água, distrófico, e cuja produtividade, em TCH, dificilmente atinge 68 (Prado, 2005).

A colheita da cana-de-açúcar no estado do Paraná tem sido predominantemente realizada após a queima dos canaviais, principalmente pelas condições de relevo acidentado que impossibilitam a colheita mecanizada em

algumas áreas. Porém, mesmo em áreas mecanizáveis, as usinas têm adotado a queima, pois esta prática aumenta o rendimento do corte, controla pragas e plantas daninhas e reduz custos de transporte e de carregamento (Ferreira e Dinkhysen, 2015). No Mato Grosso do Sul, a queimada de canaviais é proibida por lei e toda colheita se dá por meio do sistema mecanizado, sem queima (MPF, 2015). Já no Paraná, pela previsão legal, a abolição do fogo ocorrerá até 31 de dezembro de 2025 para áreas mecanizáveis e até 31 de dezembro de 2030 em áreas não-mecanizáveis, desde que haja tecnologia viável para a substituição (Ferreira e Dinkhysen, 2015).

2.4. Taxonomia da cana-de-açúcar

A hipótese de um ancestral comum para os gêneros do “Complexo *Saccharum*” é tida como a mais provável (Barber, 1920). Estudos citogenéticos para avaliação de progênes em cruzamentos realizados com plantas de *S. officinarum* e *Sclerostachya* (plantas que possuem número cromossômico básico de $x=10$) mostram que cinco dos dez cromossomos básicos existentes nas duas espécies são comuns, sugerindo a existência de um único ancestral com número cromossômico básico de $x=5$ (Parthasarathy, 1948). Trabalhos semelhantes realizados na progênie gerada de cruzamentos intergenéricos envolvendo *Saccharum*, *Sclerostachya* e *Narenga* também sugerem a presença de um ancestral comum de número cromossômico básico de $x=5$ (Raghavan e Govindasamy, 1956).

Estudos envolvendo a caracterização morfológica e a capacidade das espécies que compõem o “Complexo *Saccharum*” se intercruzarem sugerem a existência de um ancestral comum para todas estas espécies. Das seis espécies que compõem o gênero *Saccharum*, apenas duas são consideradas espécies selvagens: *S. spontaneum* e *S. robustum* (Daniels e Roach, 1987). Acredita-se que plantas de *S. officinarum* e *S. edule* surgiram a partir da seleção de populações selvagens de *S. robustum* e que *S. barberi* e *S. sinense* sejam espécies derivadas da hibridação natural de *S. officinarum* e *S. spontaneum*.

As plantas cultivadas atualmente surgiram principalmente da hibridação das espécies *S. officinarum* e *S. spontaneum* realizada pelos primeiros programas de melhoramento genético de cana-de-açúcar (Landell e Bressiani, 2008). Os primeiros trabalhos neste domínio começaram em uma estação de seleção em Java

(Indonésia), realizados por melhoristas holandeses. Eles adotaram o termo "nobilização" para o cruzamento de um clone "nobre" (*S.officinarum*), rico em açúcar, com um clone de uma espécie aparentada, vigoroso ou resistente a doenças (*S. spontaneum*) e diversos retrocruzamentos ao acaso do híbrido obtido com o mesmo parental "nobre" ou outro, de maneira a recuperar um fenótipo cultivável mais rústico e vigoroso. O resultado do processo de nobilização foi a gradativa recuperação da composição genética do clone "nobre" com a soma de pequena porcentagem genética do clone aparentado. A constituição genética originada de retrocruzamentos formou cultivares altamente poliplóides (Roach, 1972).

Outro fator importante que determina a variação do número de cromossomos em cana-de-açúcar é a frequente ocorrência de aneuploidia, ou seja, processo em que ocorre o ganho ou a perda de cromossomos (Price, 1957; 1963; Barreto e Simon, 1982). A aneuploidia é comum em espécie de origem poliplóide natural e híbrida (Sybenga, 1992). Casos de instabilidade cromossômica ocorrem predominantemente em plantas de origens poliplóides com alto número cromossômico (Barreto e Simon, 1982).

Em cana-de-açúcar, o número elevado de cromossomos é consequência da transmissão cromossômica irregular nas primeiras etapas da nobilização. A espécie *S. officinarum*, utilizada como parental feminino, transmite seu número somático de cromossomos ($2n=80$ cromossomos) no momento do primeiro cruzamento, para produzir a F_1 , enquanto o parental masculino, *S. spontaneum*, transmite apenas seu número "n" de cromossomos. Este fenômeno persiste até a segunda geração da mobilização e correspondente ao primeiro retrocruzamento da F_1 com o parental *S. officinarum*. Somente a partir da terceira nobilização é que o parental *S. officinarum* passa a transmitir "n" cromossomos (Bremer, 1961a, 1961b). Esta transmissão " $2n + n$ " leva a uma rápida redução do número relativo de cromossomos de *S. spontaneum* e a um rápido retorno ao tipo cultivado *S. officinarum*. A Figura 1 apresenta um esquema para ilustrar o processo de nobilização até a formação dos híbridos atuais.

Os primeiros híbridos interespecíficos oriundos destes trabalhos de nobilização foram utilizados maciçamente em cruzamentos em todos os programas de seleção através do mundo. Trata-se notadamente dos clones POJ2878, POJ2725, POJ213, de Java, e os clones Co281, Co290 de Coimbatore (Tamil Nadu, Índia). Estes primeiros híbridos interespecíficos se encontram na genealogia de

quase todas as cultivares cultivadas atualmente. Como consequência, do processo de nobilitação, houve um forte efeito de gargalo no desenvolvimento das canas modernas, pois elas são derivadas essencialmente de poucos genótipos parentais (Roach, 1989; Jackson, 2005). Na tentativa de ampliar a base genética estreita das cultivares até então desenvolvidas e conscientes desse problema, os melhoristas no início de 1960 iniciaram o uso de germoplasma selvagem nos programas de melhoramento.

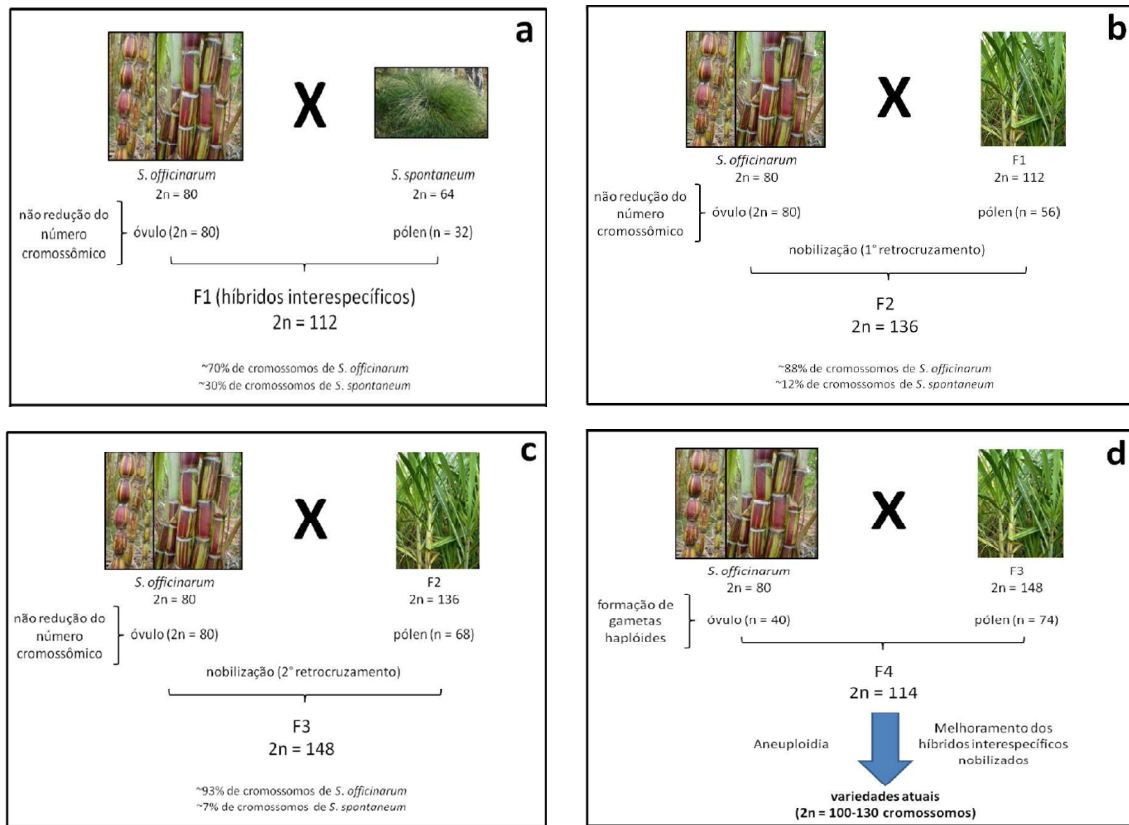


Figura 1 - Esquema mostrando os cruzamentos interespecíficos entre *S. officinarum* e *S. spontaneum* (a), formando progênie nobilitada em dois retrocruzamentos com *S. officinarum* (b, c e d) até a formação dos híbridos atuais de cana-de-açúcar. Fonte: Baseada em Ming et al., 2006 e adaptada por Jordão-Junior, 2006.

Ferrari et al. (2010) apresentaram estudo descrevendo a primeira caracterização cromossômica de três importantes cultivares brasileiras. A avaliação foi realizada a partir do número modal de cromossomos que, para a cultivar RB72454, foi descrito como $2n=112$, com amplitude de (108 - 114); para a cultivar RB835486; foi descrito como $2n=112$, com amplitude de (101 - 116); e, para a

cultivar RB867515, foi descrito como $2n=110$, com amplitude de (105 - 114). As amostras celulares foram obtidas do tecido radicular destas cultivares.

As cultivares modernas de cana-de-açúcar tem sido caracterizadas nas últimas décadas com apoio de marcadores moleculares. As informações obtidas sobre a diversidade entre cultivares (Lu et al., 1994a; Jannoo et al., 1999), entre espécies parentais (Glaszmann et al., 1990; Burnquist et al., 1992; D'hont et al., 1993; Lu et al., 1994b; Jannoo et al., 1999; Nair et al., 1999) e entre outros gêneros do complexo *Saccharum* (Aljanabi et al., 1994; Besse et al., 1996, 1997; Alix et al., 1998, 1999) ajudaram os melhoristas no uso de estratégias gerais para a exploração dos germoplasmas mais existentes.

2.5. A cultivar RB92579

A Universidade Federal de Alagoas, por meio do Programa de Melhoramento Genético da Cana-de-açúcar (PMGCA), do Centro de Ciências Agrárias (CECA), liberou, em 2003, três novas cultivares para a comunidade sucroalcooleira: a RB92579, a RB93509 e a RB931530. O início das atividades do melhoramento genético dessas três cultivares aconteceu na Estação de Floração e Cruzamento Serra do Ouro, em Murici - AL, que dispõe de banco de germoplasma, com profuso florescimento natural, permitindo a realização de cruzamentos e a obtenção de sementes para a germinação (Barbosa, 2003).

Segundo Daros et al. (2010), a cultivar RB92579 é resultante de um cruzamento biparental, tendo como cultivar progenitora a RB75126, fecundada com pólen da cultivar RB72199 (Figura 2).

O início da competição da seleção para a plântula da cultivar RB92579 ocorreu na subestação da Usina Coruripe, em 1992, e foi realizado entre 19.920 indivíduos, até que, no quinto ano (1997), esta cultivar entrou em rede experimental de diversos campos desta subestação e das Usinas Caeté e Santo Antônio e, no ano 2000, em outras empresas da região, havendo elevada multiplicação (Barbosa et al., 2003).

Passados sucessivos anos de testes em vários ambientes, as análises dos resultados e acompanhamento durante algumas safras garantiram as seguintes recomendações: a cultivar RB92579 se destaca por sua excelente produtividade agrícola, ótimo perfilhamento, bom fechamento das entrelinhas, ótima brotação de

soqueira, garantindo longevidade dos canaviais; tem porte semi-ereto, com ótima colheabilidade; bom comportamento após períodos de seca; é altamente responsiva à irrigação e muito eficiente no uso da água; apresenta maturação média com Período Útil de Industrialização (PUI) longo; florescimento baixo; resistência à ferrugem marrom e escaldadura das folhas e moderada resistência ao carvão. É recomendada para ambientes de produção A/C e colheita entre os meses de julho e setembro (Daros et al., 2010).

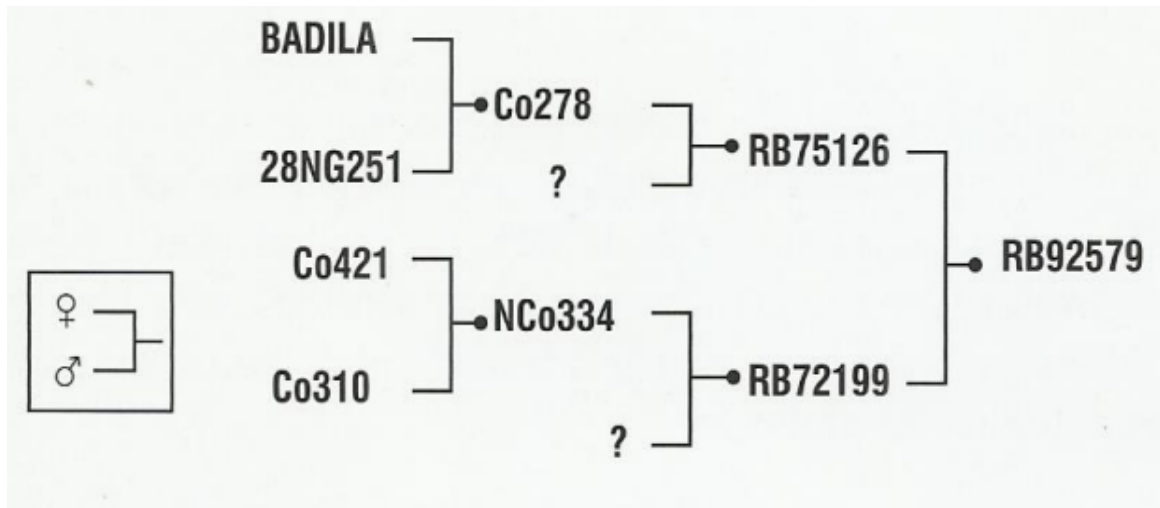


Figura 2 - Genealogia da cultivar RB92579.
Fonte: Daros et al., 2010.

A cultivar RB92579 foi desenvolvida para atender às exigências de cultivo no nordeste brasileiro, onde as irregularidades climáticas têm causado menores produtividades agrícolas quando comparadas com a região centro-sul do país (Barbosa et al., 2003).

Na safra 2008/2009, a cultivar RB92579 esteve presente em cerca de 20% da área colhida com cana no nordeste, mas foi responsável por mais de 25% dos açúcares produzidos, evidenciando, assim, alta eficiência no uso da terra. Tais características impulsionaram o cultivo da RB92579 também na região centro sul, apresentando gradativo crescimento na área plantada (Daros et al., 2010). Pelo censo varietal da RIDESA, em 2015, a RB92579 ocupou a 11ª posição em área de cultivo no estado do Paraná, com 11.252 ha, e foi a 5ª mais cultivada nos estados de São Paulo e Mato Grosso do Sul, com aproximadamente 197.781 ha (Oliveira et al., 2015).

2.6. Proteção de cultivares no Brasil

As cultivares ou novas variedades de plantas de diferentes espécies e gêneros vegetais destinadas à produção agrícola são resultantes de programas de melhoramento vegetal conduzidos pela pesquisa pública e pela iniciativa privada. Os programas de melhoramento vegetal são de longa duração, sendo que a obtenção de uma cultivar leva em torno de 8 a 12 anos, para espécies anuais, e de 20 a 30 anos, para espécies perenes, como frutíferas, videiras e florestais (Brasil, 2011). Os programas de melhoramento genético de cana-de-açúcar requerem de 9 a 12 anos para a liberação de novas cultivares (Cesnik e Miocque, 2004).

Em 1961, foi criada a União Internacional para a Proteção das Obtenções Vegetais (UPOV), com o objetivo de regulamentar sistemas efetivos de proteção de variedades de plantas, incentivando o desenvolvimento de novas variedades (UPOV, 2016). A primeira previsão de proteção de variedades vegetais no Brasil veio junto com o Código de Propriedade Industrial de 1945. Em 1997 foi sancionada a Lei de Proteção de Cultivares (LPC), instrumento vigente que institui e regula a matéria no País. Por esta lei, o Serviço Nacional de Proteção de Cultivares (SNPC), órgão criado junto ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), é o responsável por garantir (concedendo e fiscalizando) a proteção das novas variedades de plantas desenvolvidas e cultivadas no país (Brasil, 2011).

No caso de uma variedade ser cultivada fora do país, o direito do melhorista é garantido, pois o governo brasileiro é signatário da UPOV. Sendo assim, todos os países que fazem parte da UPOV obrigam-se a proteger cultivares brasileiras e, em contrapartida, o Brasil também se obriga a proteger cultivares procedentes desses países, facilitando o intercâmbio de novos materiais gerados pela pesquisa brasileira e internacional (Jordão-Junior, 2006).

Há uma série de exigências, tanto da UPOV quanto do SNPC, para que se conceda o direito de exploração comercial de uma nova variedade. O ponto fundamental para esta concessão está em conseguir distinguir esta variedade de todas as outras variedades já existentes. Para a realização desse estudo, tanto SNPC quanto UPOV propõem testes específicos para cada cultura e estes são baseados nos princípios da distinguibilidade (diferenças claras de qualquer outra cultivar já existente), Homogeneidade (testes uniformes a ponto de oferecer sempre os mesmos resultados, independente do material, técnica, ambiente e avaliador

utilizados) e Estabilidade (testes suficientemente estáveis independente do método de propagação da planta, idade ou condição fisiológica) da cultivar (Brasil, 2011; Jordão-Junior, 2006).

Descritores morfológicos não possuem, na maioria das vezes, variação (polimorfismo) suficiente para distinguir diferentes plantas (uma variedade ou acesso) de um banco de germoplasma. Além disso, descritores botânicos são sensíveis às mudanças ambientais e/ou fisiológicas, sendo instáveis e não uniformes (Jordão-Junior, 2006).

Conforme definido na Lei de Proteção de Cultivares (LPC), descritor é “a característica morfológica, fisiológica, bioquímica ou molecular que seja herdada geneticamente, utilizada na identificação de cultivar”. Muito embora os marcadores moleculares sejam capazes de detectar diferenças no DNA, somente serão considerados descritores quando se enquadrarem nos critérios expostos acima. As técnicas moleculares vêm sendo utilizadas no âmbito da proteção de cultivares como ferramentas auxiliares nas análises dos processos – por exemplo, na comprovação da origem genética da cultivar (teste de paternidade), na identificação de cultivares em casos de uso indevido e em atividades de fiscalização. Ainda que não tenham caráter decisivo, os perfis genéticos (*fingerprinting*) de cultivares, obtidos por meio de marcadores, podem ser anexados ao pedido de proteção pelos obtentores para fins de caracterização de cultivares (Brasil, 2011).

A UPOV, em diversos documentos, relata esta preocupação na intenção de procurar alternativas à instabilidade e na laboriosidade dos descritores morfofisiológicos. Desta forma, diversos documentos têm sido publicados pela UPOV, sugerindo como complementação aos descritores morfofisiológicos o uso de descritores (ou marcadores) moleculares (UPOV, 2015).

2.7. Marcadores microssatélites em cana-de-açúcar

O mais moderno e eficiente método de avaliação da diversidade genética tem sido obtido com o emprego de marcadores moleculares (Bered et al., 2002).

Um marcador molecular é um loco polimórfico que informa sobre o genótipo do indivíduo que o possui. Dessa maneira, os marcadores correspondem ao polimorfismo presente no nível do DNA. A análise desse polimorfismo por meio da biologia molecular é endereçada ao genoma como um todo, traduzido ou não em

proteínas, e independe das condições ambientais. Contrariamente aos marcadores morfológicos e bioquímicos, os marcadores moleculares de DNA não dependem do tipo de tecido analisado, nem do estágio de desenvolvimento da planta (Carrer et al., 2010). Atualmente, esses marcadores são utilizados com as mais diversas finalidades genéticas, desde testes de paternidade e identificação de parentesco até a construção de mapas genéticos complexos (Rocha et al., 2003).

Existem diversos tipos de marcadores moleculares de DNA. Cada marcador possui vantagens e desvantagens em seu uso, dependendo da aplicação que se deseja ou do investimento financeiro disponível. Os principais tipos de marcadores de DNA existentes atualmente são os marcadores RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) e microssatélites ou SSR (*Simple Sequence Repeats*).

Os SSRs, também denominados de microssatélites, são unidades muito curtas (2 a 6 pb) de motivos repetidos em *tandem*, ou seja, uma após a outra; um exemplo desta definição é o microssatélite constituído pelos dinucleotídeos AC repetidos 8 vezes [(AC)₈ – ACACACACACACACAC]. Os microssatélites estão distribuídos ao longo de todo o genoma e são flanqueados por sequências altamente conservadas e utilizadas para a confecção de *primers*. As sequências de microssatélites ocorrem tanto em regiões codificadoras quanto naquelas que não codificam (Ramalho et al., 2012). Estas sequências apresentam alto grau de polimorfismo (Zane et al., 2002).

Microssatélites podem ser detectados pelo uso da técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*), utilizando-se *primers* específicos (geralmente de 20 a 25 pb) para as regiões do DNA que flanqueiam as repetições. Os produtos da PCR são visualizados por diferentes métodos cromatográficos (Gupta et al., 1996). O conjunto de fragmentos (ou alelos) detectados para um loco é chamado de haplótipo. Um ou mais haplótipos produzem um perfil molecular, podendo ser interpretados como códigos de barras biológicos e podem gerar perfis exclusivos para cada indivíduo (Jordão-Junior, 2006).

Os SSRs são marcadores codominantes, ou seja, permitem a diferenciação dos locos em homozigose em relação aos locos em heterozigose em um indivíduo (Faleiro, 2007). O número de alelos para cada indivíduo varia de acordo com a ploidia do organismo e dose do alelo. O número máximo de alelos que pode ser

visualizado para um loco de microssatélite é igual à ploidia do organismo (ou ao número de cópias de cada cromossomo básico que um indivíduo apresenta). Em cana-de-açúcar, como o número cromossômico é variável entre indivíduos, por conta da hibridação de duas espécies de números cromossômicos diferentes e da aneuploidia, é difícil estabelecer um número máximo de alelos que pode ser visualizado por loco (Jordão-Junior, 2006). A grande quantidade de fragmentos gerados, que podem representar as cópias de alelos do mesmo loco nos vários cromossomos homólogos, dificulta a identificação dos genótipos pelo padrão visualizado na eletroforese. Assim, o padrão de polimorfismo em cana-de-açúcar é representado pela presença ou ausência de bandas individuais (Maranho, 2015).

Os microssatélites têm sido amplamente empregados na cultura da cana-de-açúcar para a análise da variação genética de indivíduos que compõem bancos de germoplasma (Tamilkumar et al., 2009; Wang et al., 2009); no mapeamento e localização de genes e QTLs (*Quantitative Trait Loci*) (Neeraja et al., 2007; Romero et al., 2009), seleção assistida por marcadores moleculares (MAS, *Marker Assisted Selection*) (He et al., 2008; Lagat et al., 2008; Ruan et al., 2009); estudos de estrutura e taxonomia populacional e relações filogenéticas (Erre et al., 2010; Guan et al., 2010; Singh et al., 2010); e também para o estudo da diversidade genética entre e dentro de cultivares comerciais (Augusto, 2013; Maranho, 2012; Maranho, 2015).

Matsuoka et al. (2005) utilizaram SSR para caracterizar 32 clones de cana-de-açúcar e verificaram que os marcadores polimórficos permitiram identificar os genótipos avaliados. Estes autores enfatizaram que este tipo de marcador pode ser utilizado de forma rápida na identificação de clones de cana-de-açúcar.

Pan (2006) utilizou um conjunto de 221 *primers* para microssatélites desenvolvidos pelo ISMC (Consórcio Internacional de Microssatélites de Cana-de-açúcar). Estes *primers* foram utilizados para estudar cinco clones elite americanos, incluindo as cultivares LCP85-384 (Louisiana), HoCP96-540 (Louisiana), CP72-1210 (Flórida) e CP85-1308 (Flórida). No total, foram identificados 467 alelos, dos quais 350 foram polimórficos, com média de cinco alelos polimórficos por marcador e os alelos variaram de 80 a 460 pb.

Maranho (2012) utilizou 17 *primers* para SSR para caracterização molecular de nove cultivares de cana-de-açúcar. Destes, dois *primers* (Ugsm148 e Ugsm59) apresentaram resultados monomórficos e recomendados para estudos de uniformidade genética de cultivares de cana-de-açúcar. Os demais *primers*

(Ugmsm38, Segms240, Segms1069, Smc226CG, EstB130, Smc1237FL, Smc165A, Ugsm117, EstB41, EstB145, Smc1047HA, Smc2017FL, EstC66, mSscir56, e EstB50) avaliaram sequências polimórficas, apresentando 70 alelos diferentes, com média de 4,12 alelos por loco. Este autor concluiu que o polimorfismo dos locos avaliados por estes *primers* evidenciou a existência de alta diversidade genética entre e dentro das cultivares estudadas.

Na atualidade, os projetos de sequenciamento de etiquetas de sequências expressas (ESTs) têm permitido o desenvolvimento de microssatélites de forma rápida e econômica pela simples mineração de sequências repetitivas nos bancos de dados. Tais microssatélites, por derivarem de ESTs, são chamados de microssatélites funcionais (EST-SSRs) e são considerados de grande utilidade para acessar a diversidade ao nível de genes expressos em coleções de germoplasma e também no mapeamento genético (Silva, 2012).

2.8. Marcadores EST-SSR em cana-de-açúcar

ESTs (*Expressed Sequence Tags* ou Etiquetas de Sequências Expressas) são sequências de DNA desenhadas a partir de segmentos de mRNAs, revelando quais são os genes expressos em um tecido ou órgão, em uma dada situação fisiológica ou patológica da planta (Souza et al., 2015).

Os EST-SSR (microssatélites desenvolvidos a partir de etiquetas de sequências expressas) representam a fração transcrita do genoma, facilitando a discriminação das sequências alvo, tal como os genes relacionados com as características de interesse agrônômico, especialmente em plantas poliplóides (Oliveira et al., 2009).

Segundo alguns investigadores, existem inúmeras vantagens na utilização de sequências expressas como marcadores genéticos, em relação a sequências anônimas de DNA: **(1)** se o marcador EST estiver geneticamente associado com uma característica de interesse, é provável que o mesmo afete diretamente a característica (Cato et al., 2001; Chen et al., 2001; Thiel et al., 2003). Desta forma, os marcadores derivados das ESTs oferecem oportunidades para a descoberta de genes; **(2)** como os marcadores derivados de ESTs encontram-se em regiões transcritas do genoma, os sítios de *primers* são mais conservados, tornando-os mais transferíveis entre espécies e aumentando seu valor em programas de

melhoramento (Fraser et al., 2004); (3) os marcadores ESTs que apresentam homologia com genes candidatos podem ser utilizados de forma específica para o mapeamento genético e são úteis no alinhamento de genomas entre espécies relacionadas para análise comparativa (Holton et al., 2002).

Os microssatélites apresentam distribuição aproximadamente aleatória no genoma, embora haja regiões com maiores abundâncias dessas sequências, como as regiões próximas ao centrômero e dos telômeros. Entretanto, atualmente, vários microssatélites vêm sendo identificados dentro de genes. Há uma tendência dos microssatélites genômicos serem ligeiramente mais polimórficos do que os derivados de ESTs, provavelmente porque as regiões genômicas que não codificam são menos afetadas pela seleção natural (Ramalho, 2012). Tal tendência foi comprovada por Maranhão (2015) que, para estudar o polimorfismo genético da cultivar RB867515, utilizou quatro locos de sequências simples repetidas de DNA (SSR) e cinco locos de sequências simples repetidas expressas (EST-SSR). O número de alelos em sequências EST-SSR foi menor (1,8 alelos por locos) que o número de alelos em sequências SSR (2,0 alelos por locos).

O projeto SUCEST (*Sugarcane Expressed Sequence Tag*) representa a maior coleção de ESTs de cana-de-açúcar já sequenciada. Foram identificados 40 mil *clusters* que representam genes relacionados ao controle de características de interesse agrônomo, como, por exemplo, genes associados ao estresse por frio (Nogueira et al., 2003) e também por estresse oxidativo (Kurama et al., 2002); genes inibidores de protease associados à resistência a patógeno (Falco e Silva-Filho, 2003; Mello et al., 2003; Soares-Costa et al., 2002); especificidade de tecido envolvida na transdução de sinal (Papini-Terzi et al., 2005) e também avaliação da especificidade de transposons (Araujo, 2005).

Dos 40 mil *clusters* já identificados, cerca de 2000 contém sequências repetitivas (SSRs) e podem ser utilizados para gerar marcadores moleculares EST-SSR para cana-de-açúcar (Pinto et al., 2004). Dutra-filho et al. (2013) analisaram a sequência de 7 marcadores EST-SSR das cultivares RB867515, RB943365 RB863129 e 7 progênies oriundas da autofecundação de cada uma dessas cultivares comerciais. Amplificaram um total de 38 alelos, dos quais 34 foram polimórficos (89,47%) e quatro foram monomórficos (10,53%).

Maranhão (2015) trabalhou com 80 plantas da cultivar RB867515 de uma mesma região edafoclimática, para estimar o polimorfismo em 9 locos de SSR e

EST-SSR. Os locos *EstB92*, *EstC84* e *Ugsm38* foram monomórficos, mas as evidências de polimorfismo nos demais locos (*EstA68*, *EstB145*, *EstC66*, *Ugsm51*, *Smc1237* e *Segms1069*) são de que a cultivar RB867515 apresenta variabilidade em nível molecular e potencial para compor programas de melhoramento.

Augusto (2013) analisou as sequências de 13 marcadores EST-SSR (*EstC66*, *EstB41*, *EstB60*, *EstB130*, *EstB145*, *EstB92*, *EstA68*, *EstC69*, *EstC91*, *EstC83*, *EstC67*, *EstC84* e *SMc165A*) das cultivares RB72454, RB867515, RB92579 e SP81-3250 cultivadas no Paraná e, entre as cultivares, RB92579 e SP81-3250, cultivadas nos Estados do Paraná e Pernambuco. Encontrou evidências de que o conteúdo genético das cultivares estudadas é instável quando estas são comparadas para os diferentes estágios de corte e em regiões edafoclimáticas diferentes.

Em outro trabalho, utilizando os mesmos dados, Augusto et al. (2015) fizeram uma associação das homologias dos locos EST-SSR (proteínas e enzimas específicas) com o grau de polimorfismo encontrado para estas sequências. Encontraram alto grau de polimorfismo nos locos *EstC67* e *EstC69*, que codificam respectivamente para β -amilase e celulose sintase. Em função do polimorfismo observado, estes autores sugerem adaptações industriais diferenciadas no pré-tratamento e no processo de hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar a partir das cultivares estudadas. Os autores acreditam que esses procedimentos poderão otimizar a produção de etanol a partir de biomassa lignocelulósica por fábricas de álcool.

O emprego da análise de EST-SSR tem sido escolhido para o estudo de diversas espécies por ser uma técnica simples, eficiente, possuir alta reprodutibilidade e revelar altas frequências de alelos polimórficos nos genomas (Reddy et al., 2002). Vários estudos têm apresentado alto conteúdo de informação genética revelado por estes marcadores, que parecem ser especialmente apropriados para estudos filogenéticos e para a avaliação da diversidade genética (Rakoczy-Trojanowska e Bolibok, 2004).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Locais de coleta do material biológico

Foram coletadas aproximadamente 200 amostras da cultivar RB92579 de cana-de-açúcar em duas localidades do Brasil. Uma das coletas foi realizada no município de Mandaguaçu-PR, situado na Latitude 23°19'12.58"S e Longitude 52°8'24.30"W e em outra área no município de Angélica-MS, situado na Latitude 21°59'14.63"S e Longitude 53°54'24.95"W. O cultivo da cana-de-açúcar nas duas localidades apresenta algumas diferenças quanto aos aspectos edafoclimáticos e de manejo realizado pelas usinas, as quais estão apresentadas no Quadro 1.

Quadro 1 - Informações edafoclimáticas das áreas de coleta da cultivar RB92579 de *Saccharum* spp. nos municípios de Mandaguaçu - PR e Angélica - MS e informações sobre o manejo desta cultivar nestes dois locais

Informações	Mandaguaçu - PR	Angélica - MS
Estágio de Corte ¹	4° (terceira soca)	4° (terceira soca)
Propagação ¹	Colmo	Colmo
Tratamento Térmico ¹	Não	Não
Ambiente de Produção ¹	E	C
Precipitação Média (mm) ²	1302	1501
Temperatura Média (°C) ²	18,6	23,1
Danos por Geada ¹	Não	Não
Colheita ¹	Mecanizada	Mecanizada
Queima da palhada ¹	Sim	Não

1- Informações repassadas pela equipe responsável de cada usina.

2-Fonte: CLIMATE.DATA.ORG, 2015.

3.2. Coleta das amostras

Em cada localidade (Mandaguaçu - PR e Angélica - MS), foram coletadas aproximadamente 100 amostras da cultivar RB92579. A coleta foi realizada de forma aleatória, estabelecendo uma coleta em zigue-zague de forma a representar o talhão em sua totalidade.

O material biológico (300 mg de folhas) foi coletado de plantas no 4º estágio de corte, com aproximadamente 40 dias após a emergência (rebrota). A folha coletada foi a +1, conforme a classificação de Kuijper (Dillewijn, 1952), por ser mais nova e conter menos fibras, facilitando o processo de extração do DNA. As amostras de folhas coletadas no campo foram acondicionadas em saquinhos de papel alumínio e armazenadas em gelo e caixa térmica, até serem encaminhadas para o Laboratório de Cultura de Tecidos e Eletroforese de Vegetais (LCTVE). No laboratório, as amostras foram congeladas em nitrogênio líquido por aproximadamente 5 minutos e armazenadas em ultrafreezer (-80 °C) até serem utilizadas no processo de extração do DNA.

3.3. Extração e quantificação do DNA

Para a extração do DNA, foi utilizado o protocolo descrito por Aljanabi et al. (1999), com maior concentração de NaCl, conforme descrito por Resende et al. (2006). Para a extração, foram utilizadas 250 mg de tecido fresco de cada amostra e estas foram maceradas e pulverizadas com nitrogênio líquido. O pulverizado foi ressuspenso com 300 µL de tampão de extração (Tris/HCl 200 mM pH 8,0; EDTA 50 mM pH 8,0; NaCl 2,2 M; CTAB 2% e Sulfito de Sódio 0,06%) e 100 µL de cada reagente de solubilização de membrana (CTAB 20%, N-Lauril Sarcosina 5% e PVP-40 10%). As amostras foram incubadas em banho-maria, durante 60 minutos, a 65 °C, e, após este período, foram adicionados em cada amostra 600 µL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico na proporção 25:24:1. Após a centrifugação a 10.000 r.p.m., por 10 minutos, em temperatura ambiente, o sobrenadante foi recuperado e a este foram adicionados 3 µL de RNase (20 ng/µL) e mantido em temperatura ambiente por 2 horas. Após essa etapa, foram adicionados 600 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) e repetido o mesmo processo de centrifugação descrito anteriormente. O sobrenadante foi recuperado e a este volume foram adicionados 0,6 vezes do volume de isopropanol e 0,06 vezes do volume de NaCl 5 M. Para a precipitação do DNA, as amostras foram mantidas *overnight* em -20 °C. Após este período, foi realizada uma centrifugação a 10.000 r.p.m., por 20 minutos a 4 °C, e o precipitado foi lavado com 500 µL de etanol 95%. Este procedimento foi repetido por mais duas vezes com o mesmo processo de centrifugação descrito no

passo anterior. Após a última centrifugação, o *pellet* de DNA foi seco e então ressuspenso em 60 µL de TE (Tris/HCl 10 mM pH 8,0 e EDTA 1 mM pH 8,0).

Para a quantificação do DNA, foi utilizado o equipamento Picodrop Spectrophotometer (Pico 100 – Version 4.0/21/03/11). Após a quantificação, os DNAs das amostras foram diluídos em água Mili-Q (*Millipore Corporation*), para uso na concentração de 10 ng/µL.

3.4. Amplificação do DNA

Para o estudo de identidade genética, os DNAs de 92 amostras foram amplificados, sendo 46 amostras do estado do Paraná e 46 do estado do Mato Grosso do Sul. Estas amostras foram amplificadas utilizando um termociclador Techne TC-512. As reações de PCR com volume final de 20 µL foram preparadas com 13,1 µL de água Milli-Q (*Millipore Corporation*), 1,5 µL de DNA genômico (10 ng/µL), 0,4 µL de *primer forward* e *reverse* (Invitrogen, Life Technologies Corporation), 0,8 µL de dNTPs, 1,6 µL de MgCl₂ (2 mM), 0,2 µL (1 U) de Platinum® *Taq* DNA polimerase (Invitrogen), 2,0 µL de *buffer* 1x (Invitrogen).

Foram utilizados 12 *primers* para amplificar as amostras de DNA, todos com temperatura de anelamento, utilizando o programa *Touchdown-PCR* (Don et al., 1991). Suas respectivas seqüências estão dispostas no Quadro 2.

No programa *Touchdown-PCR*, a cada ciclo, durante os 10 primeiros, o anelamento é feito com a redução de 1 °C a cada ciclo. O procedimento é composto por duas etapas. Na primeira etapa ocorre a desnaturação inicial por 1 minuto em 94 °C seguido de 10 ciclos; cada ciclo é realizado com 1 minuto em 94 °C (desnaturação), 1 minuto em 65 °C (anelamento), onde ocorre a redução de 1 °C a cada ciclo e 2 minutos em 72 °C (extensão). Na segunda etapa, são mais 20 ciclos de 1 minuto em 94 °C (desnaturação), 1 minuto em 55 °C (anelamento) e 2 minutos em 72 °C (extensão), sendo finalizado com extensão final de 5 minutos em 72 °C.

As seqüências dos EST-SSR são procedentes das bibliotecas de seqüências expressas (EST-SSR) a partir da pesquisa na biblioteca de seqüências expressas do SUCEST. A homologia dos *primers* selecionados está apresentada no Quadro 3.

Quadro 2 - *Primers* usados para amplificar o DNA genômico de cana-de-açúcar, com os motivos e número de repetições e suas respectivas sequências

<i>Primers</i>	Repetição SSR	Tamanho(pares de Base)	Sequência <i>Forward</i> do <i>primer</i>
			Sequência <i>Reverse</i> do <i>primer</i>
<i>EstB58</i>	(CCA) ₆	127-205	GACGGTCCCGCTCTTGTCTTGTA TCCGTGAGCAAAGACAACCTGACCT
<i>EstB149</i>	(GGA) ₆	105-149	CGAGAGGAGCTACCGGTCAGTGTC CGAGCTCGTTGCGGTTGTGG
<i>EstC45</i>	(ATTG) ₅	106-168	GCCGCCGTCGCTGGATTG GATGGATCCCCGCCTACCCTACAC
<i>EstC69</i>	(AAAC) ₄	155-162	GAACGACGAGCAAGGGAAGGAATG CAATAAGGCAGGACGGAACAGATG
<i>EstC80</i>	(ATTC) ₃	219-277	ATTCTTTCTCCCCCTGTTGTGC GTCGCCAGATCGCTTTTCGTT
<i>EstC84</i>	(GCCT) ₄	292-371	AAGCCGGTTCCAGTCCAG GCAACCAAAAAGGCTCAGAACAG
<i>EstC113</i>	(ACAT) ₃	-	CGTCCGCTAGGGCCGATTCCACTCT GACTAATAGCTGAAGCCGACCAACT
<i>EstC119</i>	(AAGC) ₄	84-326	GGAATTAAGCTTTGCCGACACCAC GGCAGCACCTCCCCTTCACC
<i>mSSCIR52</i>	(GT) ₈ GC(GT) ₆ GC(GT) ₈	120-170	ACAAGGGAAGACAAATCAG ACCAAACCACAAAGCAAA
<i>Smc2017Fl</i>	(CTT) ₁₃	219-258	CACAAGTGAAGATAATAGTGTCCCT GATCCCAAATCCCTTGATCTC
<i>Smc226CG</i>	(CA) ₁₀	131-168	GAGGCTCAGAAGCTGGCAT ACCTCTATTTCCGAGTTGGT
<i>Smc477CG</i>	(CA) ₃₁	90-130	CCAACAACGAATTGTGCATGT CCTGGTTGGCTACCTGTCTTCA

Fonte: Cordeiro et al. (2000), Singh et al. (2008) e Oliveira et al. (2009).

Após a reação de PCR, as amostras foram armazenadas em *freezer* com temperatura de -20 °C. Os segmentos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose a 4%, composto por 50% Agarose Ultrapura e 50% Agarose Metaphor™, utilizando tampão TBE 0,5X (44,5 mM Tris, 44,5 mM ácido bórico e 1 mM EDTA). Foi aplicada uma voltagem de 60 Volts durante 4 horas, utilizando *ladder* (Invitrogen) de 100 pb como marcador de peso molecular. Após a eletroforese, o gel foi corado em banho de brometo de etídio a 0,5 µg/mL, por 30 minutos, e, posteriormente, fotografado utilizando transluminador com luz UV da *Loccus* Biotecnologia e *software L-Piximage 1.21*.

Quadro 3 – Os oito locos EST-SSR com suas homologias identificadas pelo banco de dados da SUCEST

Locos EST-SSR	Homologia identificada
<i>EstB58</i>	Putative myb protein
<i>EstB149</i>	Cellulose synthase-7
<i>EstC45</i>	SbPCL1
<i>EstC69</i>	Cellulose synthase-6
<i>EstC80</i>	Glycosyltransferase
<i>EstC84</i>	Putative acetyl-CoA C-acyltransferase
<i>EstC113</i>	Putative thaumatin-like protein
<i>EstC119</i>	Putative leucine-rich repeat transmembrane protein kinase

Fonte: Oliveira et al. (2009)

3.5. Análise estatística dos dados

Os géis foram lidos manualmente e estes dados foram transferidos para uma planilha para construção de uma matriz, formada pela combinação dos marcadores detectados para os indivíduos analisados.

No contexto poliplóide da cana-de-açúcar, a presença de bandas sugeriu que determinado alelo, para um determinado loco esteve presente em pelo menos um dos cromossomos que formam um grupo de homologia, enquanto a ausência de bandas sugeriu que esse mesmo alelo não se fez presente em nenhum dos cromossomos. Assim, todos os alelos identificados foram organizados em uma matriz de dados binários, onde a presença do alelo foi codificada como “1” e a ausência do alelo foi codificada como “0”.

Para as análises, foram usados os programas estatísticos: GenAlEx (*Genetic Analysis in Excel*) (Peakall e Smouse, 2012) e o STRUCTURE 2.3.4. (Pritchard et al., 2000) e POPGENE 1.32 (Yeh et al., 1999). O programa GenAlEx foi utilizado para calcular a percentagem de variância molecular dentro e entre as localidades, por meio da análise da variância molecular (AMOVA). Também foi avaliada a percentagem de locos polimórficos, heterozigosidade esperada e a distância e identidade genética de Nei (1978).

Os locos *EstC69* e *EstC80* foram analisados como marcadores codominantes, utilizando o programa POPGENE para calcular os índices de diversidade genética. Foi utilizado também o programa STRUCTURE v 2.3.4., que se baseia na determinação de grupos heteróticos a partir de dados moleculares.

Evanno et al. (2005) sugeriram estimar ΔK como:

$$\Delta K = \frac{\{avg [L(K+1)] - 2avg [L(K)] + avg [L(K-1)]\}}{sd [L(K)]}$$

onde *avg* é a média aritmética nas repetições e *sd* é o desvio padrão da repetição L(K). O valor de K corresponde ao valor médio da distribuição de ΔK (Rodríguez-Ramilo et al., 2009).

Por meio dos conceitos referidos acima, foi realizada a análise implementada pelo programa STRUCTURE v. 2.3.4., que tem como base o modelo de separação de grupos (*clusters*), que atribui indivíduos a um número K de populações, com base na estimativa Bayesiana, em conformidade aos equilíbrios esperados de Hardy-Weinberg e ausência de desequilíbrio de ligação entre os locos analisados, dentro de cada população. Esta análise foi realizada com valor de *length burning* de 5000, com valor de Markov Chain Monte Carlo (MCMC) de 50.000 e valor de corte de 10%. Foram testados de K= 2 a K= 4. O *software* STRUCTURE HARVESTER v.0.6.1 (Earl e VonHold, 2011) foi usado para processar os arquivos de resultados do STRUCTURE v 2.3.4.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise dos doze locos SSR, sendo 8 EST-SSR e 4 SSR (Quadro 2), para as 92 amostras da cultivar RB92579 de cana-de-açúcar, 46 amostras provenientes do Paraná e 46 amostras provenientes do Mato Grosso do Sul, evidenciaram três alelos nos locos *EstC80*, *Smc226CG*, *Smc2007* e *EstC45*, dois alelos nos locos *EstC119*, *EstC69*, *EstC84*, *EstB58* (Figura 3) e *mSSCIR52*, enquanto os locos *Smc477CG*, *EstC113* e *EstB149* (Figura 4) apresentaram apenas um alelo.

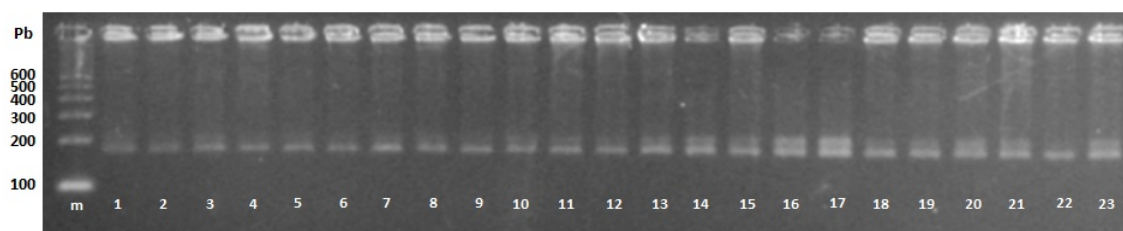


Figura 3 – Gel de agarose 4% apresentando os produtos de amplificação do DNA da cultivar RB92579 de cana-de-açúcar utilizando o *primer EstB58*. **m** é o *Ladder* de 100 pb utilizado como marcador de peso molecular; **1-23** são amostras provenientes de Mandaguaçu – PR.

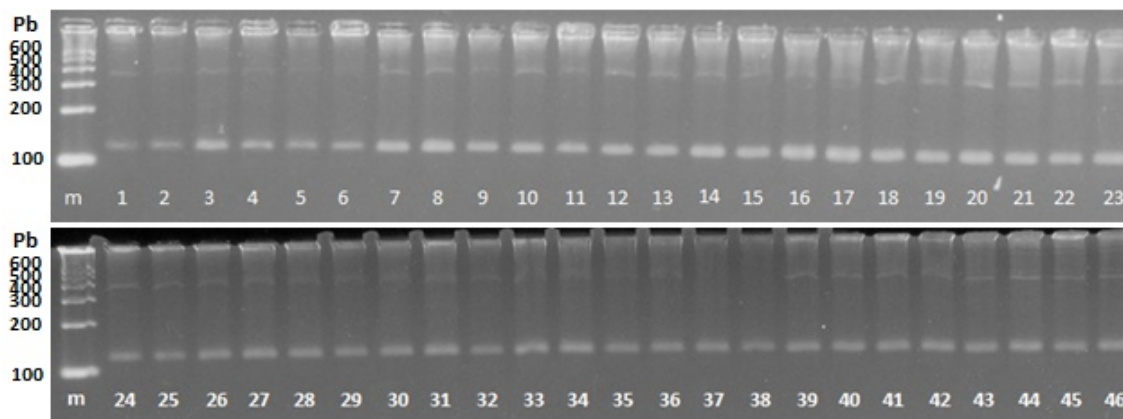


Figura 4 – Gel de agarose 4% apresentando os produtos de amplificação do DNA da cultivar RB92579 de cana-de-açúcar utilizando o *primer EstB149*. **m** é o *Ladder* de 100 pb utilizado como marcador de peso molecular; amostras de **1-23** são provenientes de Mandaguaçu - PR e as amostras de **24-46** são provenientes de Angélica - MS.

Seis locos (*EstC80*, *Smc226CG*, *EstC69*, *EstB58*, *mSSCIR52* e *EstC45*) apresentaram polimorfismo, enquanto os outros seis locos (*Smc2007*, *EstC119*,

EstC84, *Smc477CG*, *EstC113* e *EstB149*) foram monomórficos. Portanto, a proporção de locos polimórficos foi de 50%. Valores maiores de polimorfismo nos locos SSR de cana-de-açúcar foram encontrados e descritos por Cordeiro et al. (2000), que encontraram 91%, e por Oliveira et al. (2009), que encontraram 93% de polimorfismo trabalhando com EST-SSR em *Saccharum* spp.

Em nenhum dos locos monomórficos (*Smc2007*, *EstC119*, *EstC84*, *Smc477CG*, *EstC113* e *EstB149*) observou-se diferença de perfil molecular, ou qualquer modificação que descaracterizasse a identidade genética da cultivar RB92579, mesmo para regiões edafoclimáticas distintas (Paraná e Mato Grosso do Sul). Tais locos podem ser utilizados no processo de identificação genética (*fingerprint*) da cultivar RB92579 como ferramenta auxiliar aos processos de identificação varietal tradicionais (baseado em descritores morfofisiológicos). Como não foram utilizadas diferentes variedades no presente estudo, não se pode recomendar a utilização destes locos no processo de distinguibilidade, ou seja, na diferenciação de variedades; o que se recomenda é a utilização destes locos na aferição da identidade genética da cultivar RB92579. Outros estudos podem ser realizados com esses locos, utilizando um conjunto de variedades distintas para aferir seu poder de distinguibilidade em sistemas de genotipagem de cana-de-açúcar.

Diante das evidências de polimorfismo de alguns locos para amostras da mesma variedade (RB92579), é importante que, ao estabelecer locos para *fingerprint* de cultivares de cana-de-açúcar, estes sejam analisados em vários indivíduos dentro da mesma cultivar, a fim de verificar a homogeneidade dos padrões eletroforéticos destes locos nas diferentes plantas.

Para os 12 microssatélites estudados na cultivar RB92579, foram encontrados 25 alelos, com uma média de 2,08 alelos por loco analisado. Duarte-Filho et al. (2010) encontraram uma quantidade média de 3,2 alelos por loco, usando 18 marcadores SSR e avaliando 30 cultivares da RIDEA (RB).

O número de alelos em sequências simples repetidas em locos de sequências de DNA que são expressas (EST-SSR) foi menor (2,0 alelos por loco) que o número de alelos em sequências simples repetidas de locos que não são expressos (2,25 alelos por loco), valor muito próximo ao encontrados por Maranhão (2015), que observou 1,8 alelos por loco EST-SSR e 2,0 alelos por loco SSR, ao analisar a cultivar RB867515. Existe a expectativa de que as sequências EST-SSR

sejam mais conservadas e menos polimórficas do que as regiões de DNA não associadas a um papel funcional, como é o caso das sequências repetitivas (SSR). Quando a alteração ocorre em uma sequência expressa, a proteína pode ou não ser expressa, ou poderá perder sua função. Esta alteração pode não ser adaptativamente positiva tendendo a não ser selecionada durante o processo de melhoramento genético (Hoffmann e Barroso, 2006). Dos 25 alelos encontrados para os 12 microssatélites estudados, sete foram polimórficos, conferindo um polimorfismo de 28% para ambas as regiões de cultivo.

O número de alelos efetivos foi maior nas plantas cultivadas no Paraná - PR ($N_e = 1,141$) que nas plantas cultivadas no Mato Grosso do Sul - MS ($N_e = 1,169$) (Quadro 4). Os valores de H_e e do índice informativo de Shannon (I) também foram maiores nas amostras de RB92579 cultivadas no Paraná ($H_e = 0,098$ e $I = 0,1455$) que nas amostras cultivadas no Mato Grosso do Sul ($H_e = 0,086$ e $I = 0,1327$) (Quadro 4).

Quadro 4 – Número de indivíduos (N), número de alelos por loco (Na), número efetivo de alelos (N_e), heterozigosidade esperada (H_e), heterozigosidade observada (H_o), diversidade genética de Nei (1973) (h), índice informativo de Shannon (I) e porcentagem de alelos polimórficos (%P), nas amostras da cultivar RB92579, cultivadas em Mandaguaçu estado do Paraná - PR e Angélica Mato Grosso do Sul – MS

Localidades	N	Na	N_e	H_e	H_o	h	I	%P
Paraná	46	1,28	1,169	0,098	0,849	0,098	0,1455	28
Mato Grosso do Sul	46	1,28	1,141	0,086	0,820	0,086	0,1327	28
Média	46	1,28	1,155	0,092	0,835	0,093	0,1408	28

Augusto (2013), em seu trabalho estudando o polimorfismo genético da cultivar RB92579 provenientes do Paraná - PR e de Pernambuco - PE, encontrou maior número de alelos efetivos nas plantas cultivadas em PE ($N_e = 2,0878$) do que nas plantas cultivadas no PR ($N_e = 1,6566$). Os valores de H_o , H_e e porcentagem de locos polimórficos também foram maiores nas amostras cultivadas em PE ($H_o = 0,50$; $H_e = 0,4338$ e 90%) que nas amostras cultivadas no PR ($H_o = 0,4733$; $H_e = 0,3340$ e 80%). Já Maranhão (2012), também estudando a cultivar RB92579 proveniente do Paraná, obteve $H_o = 0,8080$ e 93,75% de locos polimórficos. Tais diferenças entre os valores encontrados pelos três trabalhos, principalmente em relação à porcentagem

de locos polimórficos para amostras do mesmo estado (Paraná), podem estar relacionadas à diferença entre o número amostral utilizado, que foi de 46, 15 e 8 plantas para este trabalho, o trabalho de Augusto (2013) e o de Maranhão (2012), respectivamente. Desta forma, elevadas porcentagens de locos polimórficos foram sugeridos a partir da análise de um pequeno número de amostras (15 e 8 amostras).

As duas regiões de coleta da cultivar RB92579 para o presente trabalho apresentam semelhanças e diferenças de cunho edafoclimático e de manejo da cultura, como observado no Quadro 1. Tanto em Mandaguaçu - PR, como em Angélica - MS, as áreas encontram-se no quarto estágio de corte; foram propagadas vegetativamente via colmos, sem passarem pelo processo de tratamento térmico; todas as colheitas foram realizadas com máquina e não foram observados casos de danos ocasionados por geadas.

O plantio da cana-de-açúcar pode ocorrer por meio de propagação vegetativa via colmos ou por plantas originadas de cultura de meristema *in vitro*. Segundo Phillips et al. (1990), a cultura de tecidos é um procedimento mutagênico que provoca estresse no genoma, que é levado a responder, de modo incomum, dando origem às variações somaclonais. O tratamento térmico é um método de controle fitopatológico, principalmente de doenças causadas por vírus, que consiste na exposição dos toletes de cana-de-açúcar a uma temperatura alta o suficiente para inativar o patógeno ou peste (50 – 52°C), sem afetar o poder germinativo do tecido vegetal (Fernandez-Júnior et al., 2010). A colheita pelo sistema mecanizado provoca um estresse mecânico pelo corte dos colmos e pisoteio das soqueiras, que tende a aumentar a liberação de substâncias e perda de líquidos, exigindo mais recursos para nova planta se regenerar. A geada expõe a cultura a temperaturas muito baixas que podem modificar as características de seu aparato genético e, dependendo de sua severidade, faz-se necessário o rebaixamento das plantas para que um novo ciclo comece. Nesse caso, a cultura terá avançado um ciclo em relação às demais áreas não afetadas pela geada.

As características de ambiente de produção, precipitação, temperatura e queima da palhada são diferentes nas duas localidades. Atualmente, muitas evidências indicam que a maioria dos estímulos ambientais, se não todos, agem, pelo menos em parte, modificando a atividade hormonal e/ou a expressão gênica (Guimarães, 2012). Os estímulos ambientais (redução na umidade do solo, temperatura, precipitação, etc.) provocam aumento nos níveis de determinados

reguladores de crescimento (como ácido abscísico, giberelinas, etc.), os quais podem alterar a expressão de genes específicos para uma determinada resposta final. Durante a queimada da palha da cana-de-açúcar, a temperatura chega a mais de 100° C a 1,5 centímetros de profundidade do solo e atinge 800° C a 15 centímetros acima do solo (Rossetto, 2015). Segundo UFPE (2015), os organismos estão habituados a se multiplicar numa determinada faixa de temperatura. Fora dela, as enzimas não funcionam adequadamente, inclusive aquelas responsáveis pelo reparo de DNA. Daí o aumento da taxa de mutação. Em determinados organismos, a variação de 10 °C pode duplicar a taxa de mutação. Mesmo diante destas diferenças, o valor estimado para a Identidade Genética entre as amostras da cultivar RB92579 cultivadas no PR e MS foi muito alto ($I=0,997$), indicando baixíssima variação genética entre o material cultivado nas duas regiões de cultivo, mesmo que algumas condições de cultivo e edafoclimáticas sejam diferentes para as duas regiões. Isso é um indicativo de estabilidade genética desta cultivar.

A análise de variância molecular indica que a porcentagem de variação genética entre os dois locais de coleta (amostras de Mandaguaçu-PR e Angélica-MS) foi de apenas 4%, enquanto a variação genética observada entre as amostras foi de 96% (Quadro 5). A variabilidade molecular (h) foi de apenas 0,093. Augusto (2013), também analisando a cultivar RB92579, proveniente de duas localidades (Paraná-PR e Pernambuco-PE) encontrou 53% de variação molecular dentro das amostras das duas localidades e 47% de variação entre as amostras das duas localidades (PR e PE).

Quadro 5 – Análise de variância molecular da cultivar RB92579 dentro das amostras proveniente do mesmo estado (Paraná e Mato Grosso do Sul) e entre os estados. GL: graus de liberdade; SQ: soma de quadrados; QM: quadrados médios; Comp. Var.: componentes da variância

Fonte de Variação	GL	SQ	QM	Comp. Var.	Total %
Entre Amostras	1	2,859	2,859	0,039	4
Dentro de Amostras	90	94,63	1,051	1,051	96
Total	91	97,489		1,091	100
<i>PhiPT</i> = 0,036				(P ≥ 0,010)	

PhiPT: Proporção da variância genética total entre as plantas dentro das amostras, em nível de probabilidade ($P \geq 0,010$).

A análise das 92 amostras de plantas da cultivar RB92579 de acordo com a estatística Bayesiana indicou que a frequência diferencial de alelos nos locos *EstC80*, *Smc226CG*, *Smc2007*, *EstC45*, *EstC119*, *EstC69*, *EstC84*, *EstB58*, *mSSCIR52*, *Smc477CG*, *EstC113* e *EstB149* distribuiu as plantas em três grupos ancestrais. O valor ótimo de K, determinado pela análise Bayesiana, indicou que as plantas podem ser organizadas em três grupos ($\Delta K2 = 0,00$; $\Delta K3 = 2,1836$; $\Delta K4 = 0,00$). A organização das plantas no gráfico de barras (*bar plot*) está representada na Figura 5. Cada barra no gráfico representa uma planta e a proporção de mistura de alelos ancestrais no seu genoma para os locos analisados. As cores representam os três grupos correspondentes à proporção diferencial de alelos.

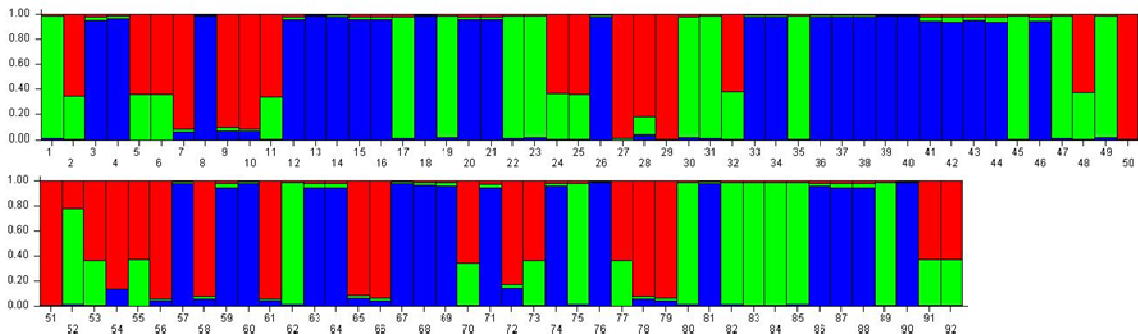


Figura 5 – Organização do *Bar plot*, baseada em 12 locos SSR e EST-SSR para a cultivar RB92579. As plantas enumeradas de 1 a 46 são provenientes de Mandaguaçu - PR e de 47 – 92 de Angélica - MS.

A análise da estrutura genética mostra que a cultivar RB92579 está constituída por três grupos de genomas ancestrais (provavelmente seus pais ancestrais), com predomínio de genoma do grupo 3 (azul 43,6%) e proporções equivalentes de genomas dos grupos 1 (vermelho 28,4%) e 2 (verde 28%).

A análise individual das plantas mostra a ocorrência de pouca mistura de genomas de dois ou três grupos ancestrais. Em cada planta, há o predomínio de genoma de apenas um dos grupos ancestrais: 43,47% das plantas são constituídas por mais de 90% de genoma ancestral do grupo 3; 20,6% das plantas são constituídas por mais de 90% de genoma ancestral do grupo 2 e 16,3% das plantas são constituídas por mais de 90% de genoma ancestral do grupo 1.

Mais de 80% das plantas têm mais de 90% de um dos 3 genomas e somente 19,56% das plantas possuem mistura em diferentes proporções de dois ou três genomas. Na genealogia descrita para a cultivar RB92579, pode ser

observado 10 genótipos diferentes (Figura 2), mas os cruzamentos entre as 10 cultivares ancestrais e os processos de seleção parecem ter levado à obtenção da cultivar RB92579 com alelos nos doze locos SSR de apenas três grupos ancestrais. O trabalho realizado por Maranhão (2015) com a cultivar RB867515 também mostra que, apesar da complexidade dos cruzamentos para a origem desta cultivar, para os nove locos SSR analisados, apenas três grupos ancestrais contribuíram para a formação desta cultivar.

Entre os doze locos analisados, oito correspondem a sequências de DNA expressas no genoma da cana-de-açúcar (*EstC80*, *EstC45*, *EstC119*, *EstC69*, *EstC84*, *EstB58*, *EstC113* e *EstB149*). A análise de SSR associados com sequências expressas é muito importante, pois estão dentro de regiões transcritas do genoma (Sterky e Lundeberg, 2000). Este fato permite uma associação direta entre genes agronomicamente interessantes. As homologias para as EST-SSR avaliadas neste trabalho estão apresentadas no Quadro 3. De acordo com as homologias relacionadas no banco de dados SUCEST, o loco *EstC84* codifica para a enzima acetil Co-A carboxilase, *EstB149* codifica para celulose sintase-7, *EstC69* para a celulose sintase-6 e *EstC80* codifica para glicosil transferase. Estas quatro enzimas ou moléculas com atividades supostamente das enzimas especificadas estão relacionadas com o metabolismo energético e/ou com a produção de miofibrilas de celulose em cana-de-açúcar e, conseqüentemente, é possível que as sequências simples repetidas contidas nestes locos possam ter sido selecionadas na geração da cultivar RB92579, associadas com características quantitativas de interesse da referida cultivar. Essa é uma hipótese que poderá ser investigada na medida em que houver características quantitativas variáveis e de interesse para o melhoramento.

Os locos *EstC84* e *EstB149* são monomórficos, isso é, o primeiro loco (*EstC84*) apresenta dois alelos observados nas 92 amostras analisadas. Portanto, todos os indivíduos são homocigotos para este. O segundo loco (*EstB149*) apresentou um só alelo para todas as amostras estudadas. É possível que o programa de melhoramento para a cultivar RB92579 tenha selecionado intrinsecamente os genótipos descritos para estes dois locos (*EstC84* e *EstB149*) no sentido de conferir uniformidade genética.

O loco *EstC69*, que supostamente codifica para a enzima celulose sintase-6, possui 2 alelos, o alelo *EstC69*¹ está presente nas 92 amostras analisadas e o alelo

*EstC69*² apresenta uma distribuição variável, com uma frequência de 0,2717. O índice informativo de Shannon (I) para este loco foi de 0,5850, a heterozigosidade esperada (He) foi de 0,3958 e a heterozigosidade observada (Ho) foi de 0,5435. Portanto, um excesso de heterozigotos foi observado para este loco e esta condição pode ser observada pelo resultado do valor de F_{IS} , que foi de -0,4145. O valor negativo deste parâmetro indica a condição de excesso de heterozigotos. Para as amostras coletadas em Mandaguaçu-PR, o índice informativo de Shannon (I) foi de 0,4943, a heterozigosidade esperada (He) foi de 0,3147 e a heterozigosidade observada (Ho) foi de 0,3913. O índice informativo de Shannon para as amostras coletadas em Angélica-MS foi de 0,6461, a heterozigosidade esperada (He) foi de 0,4537 e a heterozigosidade observada (Ho) 0,6957. O F_{ST} calculado para este loco foi de 0,0293, indicando baixa diferenciação para a cultivar RB92579, cultivada nas duas regiões do Brasil. De acordo com Wright (1978), valores de F_{ST} estendendo de 0,01 a 0,05 indicam uma baixa diferenciação entre as amostras das duas localidades.

O loco *EstC80* que codifica para a enzima glicosil transferase possui três alelos, os alelos *EstC80*¹ e *EstC80*² foram observados em todas as amostras avaliadas. O alelo *EstC80*³ aparece com a mesma frequência (0,7915) para as amostras dos dois locais de coleta. A diversidade genética (h) para este loco foi de 0,1100 e o índice informativo de Shannon foi de 0,1707.

Os resultados obtidos neste trabalho, com a avaliação de 8 locos EST-SSR (*EstC80*, *EstC45*, *EstC119*, *EstC69*, *EstC84*, *EstB58*, *EstC113* e *EstB149*) e 4 locos SSR (*Smc226CG*, *Smc2007*, *mSSCIR52* e *Smc477CG*), evidenciam que a cultivar RB92579 de cana-de-açúcar (46 amostras provenientes do Paraná e 46 amostras provenientes do Mato Grosso do Sul) apresenta baixa variabilidade em nível molecular (h= 0,093) e que somente 4% desta variação se encontra entre os dois grupos de amostras e 96% da variação molecular se encontra entre as amostras de cada localidade. Esta identidade genética (I=0,997) entre as amostras de cana-de-açúcar indica que os procedimentos realizados pela indústria sucroalcooleira pode ser o mesmo para as amostras da cultivar RB92579 provenientes de Mandaguaçu-PR e Angélica-MS.

5. CONCLUSÕES

a) A análise dos locos *EstB58*, *EstB149*, *EstC45*, *EstC69*, *EstC80*, *EstC84*, *EstC113*, *EstC119*, *mSSCIR52*, *Smc2007*, *Smc226CG* e *Smc477CG* evidenciou que a cultivar RB92579 apresenta baixa variabilidade molecular ($h=0,093$) e alta identidade genética ($I=0,997$) entre as amostras das duas localidades analisadas. Considerando esses resultados, as indústrias sucroalcooleiras de Mandaguaçu-PR e de Angélica-MS podem adotar procedimentos industriais semelhantes ao trabalharem com essa cultivar.

b) A diversidade genética em locos *EST-SSR* da cultivar RB92579 cultivada no estado do Paraná e no Mato Grosso do Sul é menor que a diversidade genética descrita em locos *SSR* de sequências não expressas de DNA.

c) Os locos *Smc2007*, *EstC119*, *EstC84*, *Smc477CG*, *EstC113* e *EstB149* podem ser recomendados para a realização de *fingerprint* da cultivar RB92579 como ferramenta auxiliar para os processos de identificação varietal tradicionais, baseados em descritores morfofisiológicos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRIANUAL. **Anuário da Agricultura Brasileira**. São Paulo: FNP, 2009. 497p.
- ALIX, K.; BAURENS, F.C.; PAULET, F.; GLASZMANN, J.C.; D'HONT, A. Isolation and characterization of a satellite DNA family in the *Saccharum* complex. **Genome**, 41:854-864, 1998.
- ALIX, K.; PAULET F.; GLASZMANN, J.C.; D'HONT, A. Inter-Alu like species-specific sequences in the *Saccharum* complex. **Theoretical and Applied Genetics**, 6:962-968, 1999.
- ALJANABI, S.M.; FORGET, L.; DOOKUN, A. An improved rapid protocol for the isolation of polysaccharide and polyphenol-free sugarcane DNA. **Plant Molecular Biology Reporter**, 17:1-8, 1999.
- AIJANABI, S.M.; MCCLELLAND, M.; PETERSEN, C.; SOBRAL, B.W.S. Phylogenetic analysis of organellar DNA sequences in the Andropogoneae: Saccharinae. **Theoretical and Applied Genetics**, 88:933-944, 1994.
- ANTONELI, V.; LOPES, J.S.F.; DOUHI, N. Esboço dos domínios morfoclimáticos e fitogeográficos do Paraná como condicionantes da paisagem. In: X SIMPÓSIO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA FÍSICA APLICADA. Rio de Janeiro, 2003. **Resumos...** Rio de Janeiro: SBGFA, 2003. p.1-11.
- ARAUJO, P.G.; ROSSI, M.; ERIKA, M.; NILO, L.; SACCARO, J.R.; KAJIHARA, M.; MASSA, D.; FELIX, R.; DRUMMOND, R.; FALCO, M.; CHABREGAS, S.; ULIAN, E.; MENOSSI, M.; MARIE-ANNE, V.A.N. Sluys Transcriptionally active transposable elements in recent hybrid sugarcane. **Plant Journal**, 44:707-717, 2005.
- AUGUSTO, R. **Instabilidade genética de cultivares de cana-de-açúcar em diferentes estágios de corte e regiões de cultivo**. Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 2013. 86p. Dissertação (Doutorado em Genética e Melhoramento).
- AUGUSTO, R.; MARANHO, R.C.; MANGOLIN, C.A. MACHADO, M.F.P.S. High Polymorphism in Est-SSR Loci for Cellulose Synthase and β -Amylase of Sugarcane

Varieties (*Saccharum* spp.) Used by the Industrial Sector for Ethanol Production. **Appl Biochem Biotechnol**, 175:965-973, 2015.

BARBER, C.A. The origin of the sugar cane. **International Sugar Journal**, 22:249-251, 1920.

BARBOSA, G.V.S.; SOUSA, A.J.R.; ROCHA, A.M.C.; SANTOS, A.V.P.; RIBEIRO, C.A.G.; BARRETO, E.J.S. MOURA-FILHO, G. SOUZA, J.L.; FERREIRA, J.L.C.; SOARES, L.; CRUZ, M.M.; FERREIRA, P.V.; SILVA, W.C.M. **Três novas cultivares RB de cana-de-açúcar**. Rio Largo: UFAL/CECA/PMGCA, 2003. 18p.

BARRETO, A.; SIMONS, J.P. Identificación de progenies Y progenitores por el análisis del número cromosómico en *Saccharum*. **Turrialba**, 32:169-180, 1982.

BERED, F.; BARBOSA NETO, J.F.; ROCHA, B.M.; IRAJÁ, F.; CARVALHO, F. Genetic variability in wheat (*Triticum aestivum* L.) germoplasm revealed by RAPD markers. **Crop Breeding and Applied Biotechnology, Londrina**, 2:499-506, 2002.

BESSE P.; MCINTYRE, C.L.; BERDING, N. Ribosomal DNA variations in *Erianthus*, a wild sugarcane relative (*Andropogoneae* x *Saccharinae*). **Theoretical and Applied Genetics**, 92:733-743, 1996.

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

BORÉM, A. **Melhoramento de plantas**. Viçosa: UFV, 1997. 574p.

BRASIL. **Proteção de cultivares no Brasil - Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento**. Brasília: Mapa/ACS, 2011. 202p.

BREMER, G. Problems in breeding and cytology of sugarcane. II. The sugarcane breeding through a cytological viewpoint. **Euphytica**, 10:121-133, 1961a.

BREMER, G. Problems in breeding and cytology of sugarcane. III. The cytological crossing research of sugarcane. **Euphytica**, 10:229-243, 1961b.

BURNQUIST, W.L.; SORRELLS, M.E.; TANKSLEY, S. Characterization of genetic variability in *Saccharum* germplasm by means of restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis. **Production International Society Sugar Cane Technologists**, 21:355-365, 1992.

CARRER, H.; BARBOSA, A.L.; RAMIRO, D.A. Biotecnologia na agricultura. **Estudos avançados**, 24:149-164, 2010.

CATO, S.A.; GARDNER, R.C.; KENT, J.; RICHARDSON, T.E. A rapid PCR-based method for genetically mapping ESTs. **Theoretical and Applied Genetics**, 102:296-306, 2001.

CESNIK, R.; MIOCQUE, J. **Melhoramento da cana-de-açúcar**. Brasília: Embrapa Informações Tecnológicas, 2004. 307p.

CHEN, X.; SALAMINI, F.; GERHARD, C. A potato molecular-function map for carbohydrate metabolism and transport. **Theoretical and Applied Genetics**, 102:284-295, 2001.

CIB. **Guia da cana-de-açúcar: avanço científico beneficia o País**. Disponível em: <http://cib.org.br/biotec-de-a-a-z/publicacoes/guia-da-cana-de-acucar/origem/>. Acesso em: 09, agosto, 2015.

CLIMATE-DATA.ORG. **Clima: Brasil**. Disponível em: <http://pt.climate-data.org/country/114/>. Acesso em: 23, novembro, 2015.

CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira cana-de-açúcar**. Disponível em: http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/15_04_13_08_49_33_boletim_cana_portugues_-_1o_lev_-_15-16.pdf. Acesso em: 12, outubro, 2015.

CORDEIRO, G.M.; CASU, R.; MCINTYRE, C.L.; MANNERS, J.M.; HENRY, R.J. Microsatellite markers from sugarcane (*Saccharum spp*) ESTs cross transferable to *Erianthus* and *Sorghum*. **Plant Science**, 24:1115-1123, 2001.

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

D'HONT, A.; LU, Y.H.; FELDMANN, P.; GLASZMANN, J.C. Cytoplasmic diversity in sugarcane revealed by heterologous probes. **Sugar Cane**, 1:12-15, 1993.

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

DAROS, E.; OLIVEIRA, R.A.; ZAMBON, J.L.C.; BESPALHOK-FILHO, J.C. **Catálogo nacional de cultivares "RB" de cana-de-açúcar**. Curitiba: AJIR, 2010. 136p.

DILLEWIJN, C. VAN. **Botany of sugarcane**. Waltham: The Chronica Botanica Co., 1952. 371p.

DOMINGUES, A.T.; THOMAZ-JUNIOR, A. A territorialização da cana-de-açúcar no Mato Grosso do Sul. **Caderno Prudentino de Geografia**, 1:138-160, 2012.

DON, R.H.; COX, P.T.; WAINWEIGHT, B.J.; BAKER, K.; MATTICK, J.S. "Touchdown" PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. **Nucleic Acid Research**, 13:4008, 1991.

DUARTE-FILHO, L.S.C.; SILVA, P.P.; SANTOS, J.M.; BARBOSA, G.V.S.; RAMALHO-NETO, C.E.; SOARES, L.; ANDRADE, J.C.F.; ALMEIDA, C. Genetic similarity among genotypes of sugarcane estimated by SSR and coefficient of parentage. **Sugar Tech**, 12:145-149, 2010.

DUTRA-FILHO, J.A.; RESENDE, L.V.; BASTOS, G.Q.; SIMÕES-NETO, D.E.; MACHADO, P.R. Use of molecular markers RAPD, and ESTs SSR to study genetic variability in sugarcane. **Revista Ciência Agrônômica**, 44:141-149, 2013.

EARL, D.A.; VONHOLDT, B.M. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. **Conservation Genetics Resources**, 4:359-361, 2011.

EMBRAPA. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. Rio de Janeiro: EMBRAPA SOLOS, 1999. 412p.

EPE - **EMPRESA DE PESQUISA ENERGÉTICA**. Disponível em: <http://www.epe.gov.br>. Acesso em: 05, novembro, 2015.

ERRE, P.; CHESSA, I.; MUÑOZ-DIEZ, C.; BELAJ, A.; RALLO, L.; TRUJILLO, I. Genetic diversity and relationships between wild and cultivated olives (*Olea europaea* L.) in Sardinia as assessed by SSR markers. **Genetic Resources and Crop Evolution**, 57:41-54, 2010.

EVANNO, G.; REGNAULT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software structure. A simulation study. **Molecular Ecology**, 14:2611-2620, 2005.

FALCO, M.C.; SILVA-FILHO, M.C. Expression of soybean proteinase inhibitors in transgenic sugarcane plants: effects on natural defense against *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). **Plant Physiology and Biochemistry**, 41:761-766, 2003.

FALEIRO, F.G. **Marcadores Genético-Moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2007. 102p.

FAOSTAT. **Food and agriculture organization of the united nations - Statistics Division**. Disponível em: <http://faostat3.fao.org/download/Q/QC/E>. Acesso em: 02, dezembro, 2015.

FERNANDES-JÚNIOR, A.R.; GANEM-JÚNIOR, E.J.; MARCHETTI, L.B.L.; URASHIMA, A.S. Avaliação de diferentes tratamentos térmicos no controle do raquitismo-da-soqueira em cana-de-açúcar. **Tropical Plant Pathology**, 35:60-64, 2010.

FERRARI, F. **Caracterização cromossômica em cana-de-açúcar (*Saccharum spp. Poaceae*)**. Campinas: Universidade Estadual de Campinas, 2010. 91p. Dissertação (Mestrado em Biologia).

FERREIRA, A.S.; DINKHYSEN, T.M.A. **Queimada controlada deve ser eliminada no Paraná até 2030**. Disponível em: <http://www.conjur.com.br/2014-abr-07/queimada-controlada-cana-eliminada-parana-2030>. Acesso em: 15, novembro, 2015.

FRASER, L.G.; HARVEY, C.F.; CROWHURST, R.N.; SILVA, H.N. EST-derived microsatellites from Actinidia species and their potential for mapping. **Theoretical and Applied Genetics**, 108:1010-1016, 2004.

GLASZMANN, J.C.; LU, Y.H.; LANAUD, C. Variation of nuclear ribosomal DNA in sugarcane. **Journal of Genetics and Breeding**, 44:191-198, 1990.

GUAN, R.; CHANG, R.; LI, Y.; WANG, L.; LIU, Z.; QIU, L. Genetic diversity comparison between chinese and japanese soybeans (*Glycine max* (L.) Merr.) revealed by nuclear SSRs. **Genetic Resources and Crop Evolution**, 57:229-242, 2010.

GUIMARÃES, J. **Produção Vegetal**. Disponível em: <http://www.ifcursos.com.br/sistema/admin/arquivos/18-59-02-apostilaproducaovegetal.pdf>. Acesso em: 25, novembro, 2015.

GUPTA, P.K.; BALYAN, H.S.; SHARMA, P.C.E.; RAMESH, B. Microsatellites in plants: a new class of molecular markers. **Current Science**, 70:45-54, 1996.

HE, X.Y.; ZHANG, Y.L.; HE, Z.H.; WU, Y.P.; XIAO, Y.G.; MA, C.X.; XIA, X.C.; Characterization of photogene synthase 1 gene (Psy1) located on common wheat chromosome 7A and development of a functional marker. **Theoretical and Applied Genetics**, 116:213-221, 2008.

HERNÁNDEZ-SALAS, J.M.; VILLA-RAMIREZ, M.S.; VELOZ-RENDÓN, J.S.; RIVERA-HERNÁNDEZ, K.N.; GONZÁLEZ-CÉSAR, R.A. Comparative hydrolysis and fermentation of sugarcane and agave bagasse. **Bioresource Technology**, 4:1238-1245, 2009.

HOFFMANN, L.V.; BARROSO, P.A.V. **Marcadores Moleculares como Ferramentas para Estudos de Genética de Plantas**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2006. 35p.

HOLTON, T.A.; CHRISTOPHER, J.T.; MCCLURE, L.; HARKER, N.; HENRY, R.J.; Identification and mapping of polymorphic SSR markers from expressed gene sequences of barley and wheat. **Molecular Breeding**, 09:63-71, 2002.

IAPAR. **Instituto Agrônômico do Paraná.** Disponível em: www.iapar.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=595. Acesso em: 4, novembro, 2015.

IMAP MS. **Bacia do Rio Ivinhema: Diagnóstico hidroambiental e socioeconômico.** Campo Grande: Imap/MS, 2006. 106p.

JACKSON, P.A. Breeding for improved sugar content in sugarcane. **Field Crops Research**, 92:277-290, 2005.

JANNOO, N.; GRIVET, L.; SEGUIN, M.; PAULET, F.; DOMAINGUE, R.; RAO, P.S.; DOOKUN, A.; D'HONT, A.; GLASZMANN, J.C. Molecular investigation of the genetic base of sugarcane cultivars. **Theoretical and Applied Genetics**, 99:171-184, 1999.

JORDÃO-JUNIOR, H. **Desenvolvimento de um sistema baseado em marcadores moleculares de DNA do tipo microssatélites para identificação de cultivares de cana-de-açúcar.** Campinas: Universidade Estadual de Campinas, 2006. 106p. Dissertação (Mestrado em Biologia Funcional e Molecular).

KURAMA, E.E.; ROSELI, E.; FENILLE, C.; VICENTE, E.; ROSA, J.R.; ROSA, D.; EUGENIO, C. Ulian^{1,2} Mining the enzymes involved in the detoxification of reactive oxygen species (ROS) in sugarcane. **Molecular Plant Pathology**, 4:251-259, 2002.

LAGAT, M.; DANSON, J.; KIMANI, M.; KURIA, A. Quantitative trait loci for resistance to maize streak virus disease in maize genotypes used in hybrid development. **African Journal of Biotechnology**, 7:2573-2577, 2008.

LANDELL, M.G.A.; BRESSIANI, J.A. Melhoramento genético, caracterização e manejo varietal. In: DINARDO-MIRANDA, L.L.; VASCONCELLOS, A.C.M.; LANDELL, M.G.A. **Cana-de-açúcar.** Campinas: IAC, 2008. p. 101-155.

LEE, T.S.G.; BRESSAN, E.A. The potential of ethanol production from sugarcane in Brazil. **Sugar Tech**, 8:195-198, 2006.

LOURENÇÃO, A.L.F. **Ocorrência de geadas em Maracajú nos últimos dezoito anos.** Disponível em: http://www.fundacaoms.org.br/base/www/fundacaoms.org.br/media/attachments/121/121/55ad43ed8e2924ce03b853463bc2e0d4bfb1adf519be4_

06-ocorrencia-de-geadas-em-maracaju-nos-ultimos-dezoito-anos.pdf. Acesso em: 15, novembro, 2015.

LU, Y.H.; D'HONT, A.; PAULET, F.; GRIVET, L.; ARNAUD, M.; GLASZMANN, J.C. Molecular diversity and genome structure in modern sugarcane varieties. **Euphytica**, 78: 217-226, 1994a.

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

MARANHO, G.B. **Análise do polimorfismo em locos EST-SSR da cultivar RB867515 de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*)**. Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 2015. 36p. Dissertação (Mestrado em Agronomia).

MARANHO, R.C. **Diversidade genética entre e dentro de cultivares de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) utilizando marcadores microssatélites**. Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 2012. 44p. Dissertação (Mestrado em Agronomia).

MARTIN, C.; GALBE, M.; WAHLBOM, C.; HAHN-HAGERDAL, B.; JONSSON, L. Ethanol production from enzymatic hydrolysates of sugarcane bagasse using recombinant xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae*. **Enzyme Microbial Technology**, 10:274-282, 2002.

MATSUOKA, S.; GARCIA, A.; ARIZONO, H. Melhoramento da cana-de-açúcar. In: BORÉM, A. **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa: UFV, 2005. p. 225-274.

Mc MARTIN, A. The role of the portuguese in the early establishment of cane sugar industries. **Agronomia Moçambicana**, 5:211-218, 1971.

MELLO, M.O.; TANAKA, A.S.; SILVA-FILHO, M.C. Molecular evolution of Bowman-Birk type proteinase inhibitors in flowering plants. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 27:103-112, 2003.

MILLER, L.C. **Tecnologia agrícola para exploração e manejo cultural da cana-de-açúcar.** Disponível em: http://www.sigacana.com.br/b_plantio%5c2_plantio.htm. Acesso em: 09, outubro, 2015.

MING, R.; MOORE, P.H.; WU, K.; D'HONT, A.; GLAZMANN, J.C.; TEW, T.L.; MIRKOV, T.E.; DA SILVA, J.; JIFON, J.; RAI, M.; SCHNELL, R.J.; BRUMBLEY, S.M.; LAKSHMANAN, P.; COMSTOCK, J.C.; PATERSON, A.H. Sugarcane improvement through breeding and biotechnology. **Plant Breeding Reviews**, 27:15-118, 2006.

MPF. **MPF consegue manter proibição da queima da cana-de-açúcar no cone sul de MS.** Disponível em: <http://www.prms.mpf.mp.br/servicos/sala-de-imprensa/noticias/2013/06/mpf-consegue-manter-proibicao-da-queima-da-cana-de-acucar-no-cone-sul-de-ms/?searchterm=None>. Acesso em: 22, novembro, 2015.

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

NEERAJA, C.N.; MAGHIRANG-RODRIGUEZ, R.; PAMPLONA, A.; HEUER, S.; COLLARD, B.C.Y.; SEPTININGSIH, E.M.; VERGARA, G.; SANCHEZ, D.; XU, K.; ISMAIL, A.M.; MacKILL, D.J. A marker-assisted backcross approach for developing submergence-tolerant rice cultivars. **Theoretical and Applied Genetics**, 115:767-776, 2007.

NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**, 89:583-590, 1978.

NEVES, M.F.; TROMBIN, V.G.; **A Dimensão do Setor Sucroenergético: Mapeamento e Qualificação da Safra 2013/2014.** Ribeirão Preto: Markestrat, 2014. 64p.

NOGUEIRA, F.T.S. RNA expression profiles and data mining of sugarcane response to low temperature. **Plant Physiology**, 132:1811-1824, 2003.

NOVACANA. **As usinas e açúcar e etanol do Brasil.** Disponível em: <http://www.novacana.com/usinas-brasil/>. Acesso em: 2, novembro, 2015.

OLIVEIRA, E.J. **Desenvolvimento e uso de marcadores microssatélites para construção e integração de mapas genéticos de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis Sims f. flavicarpa Deg.*)**. Piracicaba: Universidade de São Paulo, 2006. 152p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas).

OLIVEIRA, H.; URCHEI, M.A.; FIETZ, C.R. **Aspectos físicos e socioeconômicos da bacia hidrográfica do Rio Ivinhema**. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2000. 52p.

OLIVEIRA, K.M.; PINTO, L.R.; MARCONI, T.G.; MOLLINARI, M.; ULIAN, E.C.; CHABREGAS, S.M.; FALC, M.C.; BURNQUIST, W.; GARCIA, A.A.F.; SOUZA, A.P. Characterization of new polymorphic functional markers for sugarcane. **Genome**, 12:191–209, 2009.

OLIVEIRA, R.A.; DAROS, E. HOFFMANN, H.P. **Liberção nacional de variedades RB de cana-de-açúcar**. Curitiba: Graciosa, 2015. 72p.

PALOMINO, E.C.; MORI, E.S.; ZIMBACK, L. TAMBARUSSI, E.V.; MORAES, C.B. Genetic diversity of common bean genotypes of Carioca comercial group using RAPD markers. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, 5:80-85, 2005.

PAN, Y-B. Highly polymorphic microsatellite DNA markers for sugarcane germplasm evaluation and variety identity testing. **Sugar Tech**, 8:246-256, 2006.

PAN, Y-B.; CORDEIRO, GM.; RICHARD, EP.; HENRY.; RJ. Molecular genotyping of sugarcane clones with microsatellite DNA markers. **Maydica**, 10:319–329, 2003.

PAPINI-TERZI, F.S. Transcription profiling of signal transduction- related genes in sugarcane tissues. **DNA Research**, 12:27-38, 2005.

PARTHASARATHY, N. Origin of noble sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). **Nature**, 16:608, 1948.

PEAKALL, R.; SMOUSE, P.E. GenAIEx 6.5: genetics analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. **Bioinformatics**, 28:2537-2539, 2012.

PHILLIPS, R.L.; KAEPLER, S.M.; PESCHKE, V.M. Do we understand somaclonal variation? Progress in Plant Cellular and Molecular Biology. In: INTERNACIONAL CONGRESS ON PLANT TISSUE AND CELL CULTURE. Amsterdam, 1990.

Resumos... Amsterdam: [s.n.], 1990, p.24-29.

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

POWELL, W.; MACHRAY, G.C.; PROVAN, J.; Polymorphism revealed by simple sequence repeats. **Trends in Plant Science**, 1:215-221, 1996.

PRADO, H. Ambientes de Produção de Cana-de-Açúcar na região Centro-Sul do Brasil. **Potafós**, 110:12-17, 2005.

PRADO, H. **Solos do Brasil**. 4. ed. Piracicaba: H. do Prado, 2005. 281p.

PRICE, S. Cytological studies in *Saccharum* and allied genera. III. Chromosome numbers in interspecific hybrids. **Botanical Gazette**, 118:146-159, 1957.

PRICE, S. Cytological studies in *Saccharum* and allied genera. VIII. Progenies from 112- and 136- chromosome *S. officinarum* x *S. spontaneum* hybrids. **Botanical Gazette**, 124:186-190, 1963.

PRITCHARD, J.K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using 824 multilocus genotype data. **Genetics**, 155:945–959, 2000.

RAGHAVAN, T.S.; GOVINDASAMY, S. Phylogeny of *Saccharum* and related genera. **Proceedings of the International Society of Sugar Cane Technologists**, 9:695-708, 1956.

RAKOCZY-TROJANOWSKA, M.; BOLIBOK, H. Characteristics and a comparison of three classes of microsatellite-based markers and their application in plants. **Celular & Molecular Biology Letters**, 9:221-238, 2004.

RAMALHO, M.A.P.; SANTOS, J.B.; PINTO, C.A.B.P.; SOUZA, E.A.; GONÇALVES, F.M.A.; SOUZA, J.C. **Genética na Agropecuária**. Lavras: UFLA, 2012. 565p.

REDDY, M.P.; SARLA, N.; SIDDIQ, E.A. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. **Euphytica**, 128: 9-17, 2002.

RESENDE, A.G. **Polimorfismo de DNA em plantas regeneradas *in vitro* e nos descendentes RF₁ de *Cereus peruvianus* MILL. (CACTACEAE)**. Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 2006. 56p. Dissertação (Doutorado em Ciências Biológicas).

ROACH, B.T. Nobilisation of sugarcane. **Proceedings International Society Sugar Cane Technologists**, 14: 206-216, 1972.

ROACH, B.T. Origin and improvement of the genetic base of sugarcane. **Proceedings of the Australian Society of Sugar Cane Technologists**, 10:34-47, 1989.

ROCHA, R.B.; PEREIRA, J.F.; CRUZ, C.D.; QUEIROZ, M.V.; ARAÚJO, E.F. O mapeamento genético no melhoramento de plantas. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, 30:27-32, 2003.

RODRIGUEZ-RAMILO, S.T.; TORP, M.A.; FERNÁNDEZ J. Assessing population genetic structure via the maximisation of genetic distance. **Genetics Selection Evolution**, 41:49, 2009.

ROMERO, G.; ADEVA, C.; BATTAD II, Z. Genetic fingerprinting: Advancing the frontiers of crop biology research. **Philippine Science Letters**, 2:8-13, 2009.

ROSSETTO, R. **Árvore do conhecimento cana-de-açúcar**. Disponível em: http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01_93_22122006154841.html. Acesso em: 25, novembro, 2015.

RUAN, C.-J.; LI, H.; MOPPER, S. Characterization and identification of ISSR markers associated with resistance to dried-shrink disease in sea buckthorn. **Molecular Breeding**, 24:255-268, 2009.

SANTOS, F.; BORÉM, A.; CALDAS, C. **Cana-de-açúcar, bioenergia, açúcar e etanol – tecnologias e perspectivas**. Viçosa: UFV, 2012. 637p.

SILVA, G.C. **Diversidade genética e capacidade combinatória em cana-de-açúcar utilizando informações de pedigree e de marcadores moleculares.** Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2012. 120p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas).

SIMEPAR. **Sistema meteorológico do Paraná.** Disponível em: www.simepar.br. Acesso em: 4, novembro, 2015.

SINGH, H.; DESHMUKH, R.K.; SINGH, A.; SINGH, A.K.; GAIKWAD, K.; SHARMA, T.R.; MOHAPATRA, T.; SINGH, N.K. Highly variable SSR markers suitable for rice genotyping using agarose gels. **Molecular Breeding**, 25:359-364, 2010.

SINGH, R.K.; SRIVASTAVA, S.; SINGH, S.P.; SHARMA, M.L.; MOHOPATRA, T.; SINGH, N.K.; SINGH, S.B. Identification of new microsatellites DNA markers for sugar and related traits in sugarcane. **Sugar Tech**, 10:327-333, 2008.

SOARES-COSTA, A. A sugarcane cystatin: recombinant expression, purification, and antifungal galactin activity. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 296:194-1199, 2002.

SOUZA, G.M.; SILVA, A.M. **SUCAST.** Disponível em: <http://biotechnology.com.br/revista/bio25/sucast.pdf>. Acesso em: 09, outubro, 2015.

STERKY, F.; LUNDEBERG, J. Sequence analysis of genes and genomes. **Journal of Biotechnology**, 76:1-31, 2000.

SYBENGA, J. Cytogenetics in plant breeding. **Monographs on Theoretical and Applied Genetics**, 17:4-5, 1992.

TAMILKUMAR, P.; JERLIN, R.; SENTHIL, N.; GANESAN, K.N.; JEEVAN, R.J.; RAVEENDRAN, M. Fingerprinting of rice hybrids and their parental lines using microsatellite markers and their utilization in genetic purity assessment of hybrid rice. **Research Journal of Seed Science**, 2:40-47, 2009.

THIEL, T.; MICHALEK, W.; VARSHNEY, R.K.; GRANER, A. Exploiting EST databases for the development and characterization of gene-derived SSR-markers in

barley (*Hordeum vulgare* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, 106:411-422, 2003.

UFPE. **Portal de informação em Genética e Biologia Molecular e áreas afins – mutações e reparo**. Disponível em: <https://www.ufpe.br/biolmol/GenMendel/mutacoes&reparo.htm>. Acesso em: 25, novembro, 2015.

UPOV. **International union for the protection of new varieties of plants**. Disponível em: <http://www.upov.int/about/en/>. Acesso em: 12, janeiro, 2016.

UPOV. **Progress report of the work of the technical committee, the technical working parties and the working group on biochemical and molecular techniques, and dna-profiling in particular**. Disponível em: http://www.upov.int/meetings/en/doc_details.jsp?meeting_id=36742&doc_id=315784. Acesso em: 28, dezembro, 2015.

WANG, X.-H.; YANG, Q.-H.; LI, F.-S.; HE, L.-L.; HE, S.-C.; Molecular identification of *Saccharum* spp x *Erianthus fulvus* hybrids using sequence-characterized amplified region markers. **Crop Science**, 49:864-870, 2009.

WEI, X.; JACKSON, PA.; MCINTYRE, CL.; AITKEN, KS.; CROFT, B. Associations between DNA markers and resistance to diseases in sugarcane and effects of population substructure. **Theoretical and Applied Genetics**, 114:155-164, 2006.

WRIGHT, S. Evolution and the genetics of populations. Volume IV. **Variability within and among natural populations**. Chicago: University of Chicago Press, 1978. 580p.

YEH, F.C.; BOYLE, T.Y.Z.; XIYAN, J.M. **POPGENE Version 1.31: Microsoft Window-based freeware for population genetic analysis**. Alberta: University of Alberta and Center for International Forestry Research, 1999.

ZAEcana. **Zoneamento Agroecológico da cana-de-açúcar**. Disponível em: <http://www.cdes.gov.br/documento/2300630/zoneamento-agroecologico-da-cana-de-acucar-texto-outubro-2009-.html>. Acesso em: 5, novembro, 2015.

ZAMBON, J.L.C. **Validação do método de seleção de genótipos de cana-de-açúcar para o estado do Paraná.** Curitiba: Universidade Federal do Paraná. 2000. 111p. Tese (Doutorado em Produção Vegetal).

ZANE, L.; BARGELLONI, L.; PATARNELLO, T. Strategies for microsatellite isolation: a review. **Molecular Ecology**, 11:1-16, 2002.