

UFRRJ
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOSSANIDADE
E BIOTECNOLOGIA APLICADA

DISSERTAÇÃO

Marcadores Moleculares Associados aos Teores de
Sacarose e Fibra em Cana-de-Açúcar

Natália Arruda Sanglard

2013



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOSSANIDADE E
BIOTECNOLOGIA APLICADA**

**MARCADORES MOLECULARES ASSOCIADOS AOS TEORES DE
SACAROSE E FIBRA EM CANA-DE-AÇÚCAR**

NATÁLIA ARRUDA SANGLARD

Sob a Orientação do Professor
Dr. Valdir Diola

e Co-orientação do Professor
Dr. Carlos Frederico de Menezes Veiga

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada, Área de Concentração em **Biotecnologia Aplicada**.

Seropédica, RJ
Fevereiro de 2013

Ficha catalográfica

633.71
S22M
T

Sanglard, Natália Arruda, 1984-.
Marcadores moleculares associados aos teores de sacarose e fibra em cana-de-açúcar / Natália Arruda Sanglard. - 2013.
75 f.: il.

Orientador: Valdir Diola.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada.

Bibliografia: f. 23-42.

1. Cana-de-açúcar - Teses. 2. Cana-de-açúcar - Melhoramento genético - Teses. 3. Cana-de-açúcar - Engenharia genética - Teses. 4. Polimorfismo (Genética) - Teses. 5. Biotecnologia vegetal - Teses. 6. Alimentos - Teor de sacarose - Teses. Alimentos - Teor fibroso - Teses. I. Diola, Valdir, 1970- II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada. III. Título.

Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – A autora”.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOSSANIDADE E BIOTECNOLOGIA
APLICADA**

**MARCADORES MOLECULARES ASSOCIADOS AOS TEORES DE SACAROSE E
FIBRA EM CANA-DE-AÇÚCAR**

NATÁLIA ARRUDA SANGLARD

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada, Área de Concentração em **Biotecnologia Aplicada**.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 22/02/2013.

BANCA EXAMINADORA:

Valdir Diola. Dr. UFRRJ
(Orientador)

Maurício Ballesteiro Pereira. Dr. UFRRJ

Fabiano Salgueiro. Dr. UNIRIO

*Aos meus pais Demétrio e Sonia
Ao meu irmão Demerson
À minha tia Leonides Luíza (in memoriam)*

Dedico

*Ao povo brasileiro que por meio dos impostos, proporcionou a
manutenção da Universidade pública, gratuita e de qualidade, o que
tem viabilizado a minha formação profissional.*

Ofereço

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por me dar tantas bênçãos, inclusive a gratificação de mais uma realização em minha vida.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), em especial ao Instituto de Biologia (IB) e ao Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada (PPGFBA) pela oportunidade de realização desse trabalho.

Ao REUNI (Reestruturação e Expansão das Universidades Federais) pelo auxílio financeiro, indispensável à condução deste trabalho.

À Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroalcooleiro (RIDESA) pela parceria.

Ao meu orientador Dr. Valdir Diola (UFRRJ/IB/Depto. Genética), pela orientação constante e competente, pela paciência e compreensão. Além disso, pela amizade e valiosos ensinamentos de biologia molecular.

Ao meu co-orientador, Dr. Carlos Frederico de Menezes Veiga (UFRRJ/ Campos dos Goytacazes) pelo apoio para a realização deste trabalho.

À coordenadora do PPGFBA, Dr^a. Elen de Lima Aguiar Menezes (UFRRJ/IB/DEnF/CIMP), pelo zelo incansável com a manutenção das condições necessárias ao ensino de Pós-Graduação, pelo exemplo de dedicação ao progresso da formação científica.

A todos os professores que ministraram as disciplinas do Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada, pelos conhecimentos transmitidos.

Aos professores do Laboratório de Genética e Melhoramento Vegetal (LGMV) da UFRRJ, em especial ao Dr. Mauricio Balesteiro Pereira e Dr^a. Ana Lúcia Cunha Dornelles, que não mediram esforços em me auxiliar quando se fez necessário.

Ao Dr. Fabiano Salgueiro pela colaboração em minha formação desde a época de minha Iniciação Científica.

Aos estagiários do LGMV/UFRRJ, Érika Fernandes, Mayara Marques, Glaycianne Santos, Bianca Zandomingo e Pietro Macedo, os quais muito contribuíram sem medir esforços para a realização deste trabalho. Além disso, sou grata pelo companheirismo e amizade.

Aos demais colegas do LGMV e da UFRRJ, Andréa Pereira, Janaína Gonçalves, Uirá do Amaral, Elizabeth Ramos, Rafaela Eloi e Débora Gonzaga pelos momentos de descontração e pelo carinho.

Ao secretário do PPGFBA, Roberto Tadeu Souza de Oliveira, por sua organização ao dispor os materiais necessários à pesquisa e que sempre esteve disponível a me ajudar.

Aos professores Dr. Maurício Ballesteiro Pereira e Dr. Fabiano Salgueiro, por terem aceitado o convite para compor a banca avaliadora deste trabalho.

Aos amigos do PPGFBA, em especial a Diene Elen Miranda da Silva, Francisco Lúcio da Silva Beltrão, Kandice de Alencar Andrade, Rafaela Andrade Dias, Tathianne Pastana de Sousa Poltronieri e Vinicius de Abreu D'Ávila.

Às amigas do quarto 205 do Alojamento F4 da UFRRJ, e aos amigos de graduação pelo carinho.

Aos momentos especiais na república de Janaína Gonçalves, Vinicius de Abreu D'Ávila, Antônio Amorim, Ágatha Neves, Roberta Alencar e agregados.

A todos que me confortaram, ajudaram e me incentivaram quando fui assaltada, em especial ao meu irmão Demerson, minha cunhada Cida e aos colegas do LGMV.

Aos meus maravilhosos pais Demétrio Antônio Sanglard e Sonia Lídia Arruda Sanglard, pela participação efetiva em todos os momentos da minha vida, pela educação precisa e atenta, pelo apoio e incentivo na minha formação como Engenheira Agrônoma.

Ao querido Otaviano, pelo carinho, compreensão e incentivo.

Ao meu irmão Demerson pelo carinho durante a vida e por me ajudar a crescer e acreditar nos meus sonhos.

À minha cunhada Cida pelo carinho e apoio.

À todos que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento desta pesquisa.

Amor à Rural do RJ!

RESUMO

SANGLARD, Natália Arruda. **Marcadores moleculares associados aos teores de sacarose e fibra em cana-de-açúcar.** 2013. 75p. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada). Instituto de Biologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2013.

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) está entre as espécies de maior importância econômica no mundo, constituindo uma das principais fontes de produção de açúcar e etanol. Apresenta elevada produção de biomassa e ampla variabilidade fenotípica para os atributos de interesse. Aspectos econômicos e tecnológicos do cultivo e da cultura precisam ser melhorados visando atender as necessidades do setor sucroenergético. Dentre estes, o melhoramento genético da cultura para a produtividade de sacarose e a qualidade de fibras tem demandado significativo esforço. Um importante avanço a respeito do seu genoma tem surgido com o emprego de marcadores moleculares, especialmente aqueles ligados aos genes de interesse, a exemplo ESTs-SSRs. A análise de ESTs (*Expressed Sequence Tags*) é uma estratégia que aborda a porção expressa do genoma, ideal para a análise do polimorfismo das regiões transcritas de genomas complexos altamente redundantes, como o da cana-de-açúcar. O objetivo desse estudo foi desenvolver marcadores moleculares ESTs-SSRs discriminante de múltiplos segmentos de DNA, robustos e capazes de classificar grupos genotípicos correlacionados com os fenótipos de produção de sacarose e fibras, características econômicas importantes para a integração nos programas de melhoramento da cana-de-açúcar. A genotipagem da população foi realizada com oito combinações de primers ESTs-SSRs, selecionados a partir do banco de ESTs e aplicadas aos 81 progênies em fase T1 resultantes de um cruzamento biparental com genitores contrastantes para a característica de fibras e sacarose. Inicialmente, os primers foram aplicados aos genótipos contrastantes em quatro classes fenotípicas com 12 genótipos em cada, caracterizados para o elevado e baixo teor de açúcares e fibras. Depois da análise de ligação genética, evidenciou-se que os amplicons provenientes do conjunto de primers 1,4βMEH, DPB, CytB5 e PKL apresentaram os melhores valores de escore Z, indicando a estreita ligação com o fenótipo correspondente. Estes primers foram aplicados na população de 81 progênies T1. Verificou-se que em média 12,5 amplicons foram amplificados a cada gene, número maior que o valor básico de genomas, evidenciando a duplicação gênica. Os marcadores 1,4βMEH de tamanho inferiores a 600 pb discriminaram as características de baixa produção de sacarose e elevados teores de fibras. O conteúdo de informação do polimorfismo situou-se entre 0,51 e 0,66 e a análise genotípica estruturou seis agrupamentos cujos genótipos organizaram-se segundo o fenótipo apresentado em quatro grupos distintos e os outros dois grupos foram compostos por genótipos de valores fenotípicos intermediários. A divergência genética entre grupos genotípicos segundo a análise de multivariada foi de ~0,15. O presente estudo mostrou que o caráter fenotípico pode ser mais eficientemente controlado por determinados amplicons específicos de que pelo conjunto total de amplicons e que a contribuição da combinação destes marcadores genotípicos codifica para uma maior ou menor expressão fenotípica.

Palavras-chaves: polimorfismo, marcador funcional, genótipo associado ao fenótipo.

ABSTRACT

SANGLARD, Natalia Arruda; **Molecular markers associated with levels of sucrose and fiber in sugarcane.** 2013. 75p. Dissertation (Master Science in Phytosanitary and Applied Biotechnology). Instituto de Biologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2013.

The sugarcane (*Saccharum* spp.) is among the most economically important species in the world, constituting a major source of production of sugar and ethanol. It has high biomass production and wide phenotypic variability for the attributes of interest. The economic and technological aspects of the cultivation and crop need to be improved in order to attend the needs of the sugar-energetic sector. Among them, the genetic breeding of the crop for yield of sucrose and fiber quality has required significant effort. An important development regarding its genome has arisen with the use of molecular markers, especially those linked to genes of interest, such as ESTs- SSRs. The analysis of ESTs (Expressed Sequence Tags) is a strategy that addresses the expressed portion of the genome, ideal for polymorphism studies of transcribed regions of complex genomes highly redundant, as the sugarcane. The aim of this study was to develop molecular markers multi-allelic functional, robust and discriminatory heterotic groups with phenotypes related to plant structure, sucrose and fiber production, economic characteristics important for integration into breeding programs of sugarcane. The population genotyping was performed with eight EST-SSRs primer combinations, selected from the database of ESTs and applied to the 81 progenies in the first selection phase (T1) derived of biparental crosses with contrasting genitors for the characteristic fiber and sucrose. Initially, primers were applied to contrasting genotypes in 4 phenotypic classes with 12 genotypes in each, characterized for the high and low sugar and fiber contents. After linkage analysis showed that some amplicons dos primers 1.4 β MEH, DPB, and CytB5 PKL showed the best values of Z-score, indicating high connection with the corresponding phenotype. These primers were applied on the population of 81 progenies T1. Verified that on average 12.5 amplicons were amplified for each gene, number greater than the basic genome from plant, evidencing the gene duplication. The molecular markers 1,4 β MEH minor 600 pb they are discriminant for characteristics sucrose low production and high level of fibers. The Polymorphism Information Content was between 0.51 and 0.66. Genotypic analysis structured six groups whose genotypes were organized according to the phenotype displayed in four distinct groups and the other two groups were composed of genotypes phenotypic values intermediates. The genetic divergence between heterotic groups according to multivariate analysis was ~ 0.15 . This study showed that the phenotypic character can be more efficiently controlled by some specific amplicons that the total set, and the contribution of these alleles coding for a higher or lower phenotypic expression.

Key words: polymorphism, functional marker, genotype associated from phenotype.

LISTAS DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

- Figura 1.** Representação esquemática do genoma da variedade R570. O genoma é derivado da hibridação interespecífica entre *S. officinarum* ($2n = 8x = 80$) e *S. spontaneum* ($2n = 5x$ a $16x = 40$ a 128). 10% a 20% dos seus cromossomos são herdados de *S. spontaneum* (barras cinzas), 70% a 80% são herdados de *S. officinarum* (barras brancas) e cerca de 10% são o resultado de recombinação entre cromossomos das duas espécies ancestrais. Fonte: D'HONT et al. (2008)..... 6
- Figura 2.** Estrutura química da sacarose formada pela dimerização dos monossacarídeos frutose + glicose. Fonte: BOSCOLO (2003)..... 11
- Figura 3.** Representação das ligações inter- e intramoleculares nas cadeias de celulose (Fonte: MORGENSTERN e KAMMER, 1996)..... 14
- Figura 4.** Estrutura molecular parcial da hemicelulose..... 15

ARTIGO

- Figura 1.** Padrão de eletroforese para os múltiplos alelos do gene da (CyTB5) (acesso do NCBI: CF675654), entre 300 e 500pb com demonstrando parte dos 28 alelos amplificados, todos polimórficos. Na parte superior da figura, estão as 24 progênes RB-UFRRJ(n): 1-12 (baixo teor de PC) e 13 a 24 (alto teor)..... 48
- Figura 2.** Dendograma para o padrão de dissimilaridade genética estabelecida pelo método UPGMA, com base nos coeficientes de Jaccard, em cluster hierarquizado e os componentes de cada grupo para os 81 progênes de cana-de-açúcar..... 51

LISTAS DE TABELAS

ARTIGO

Tabela 1.	Primers utilizados para as análises do polimorfismo relacionado ao genoma funcional.....	46
Tabela 2.	Médias observadas para classes com 12 progênies de cana-de-açúcar contrastantes para a característica de teor de pol de cana - PC (%) e Fibras (%).....	48
Tabela 3.	Análise dos dados dos marcadores moleculares SSRs-ESTs segundo o polimorfismo apresentado para PC e fibra segundo as classes fenotípicas contendo 12 progênies em cada.....	49
Tabela 4.	Análise dos dados dos marcadores moleculares ESTs-SSRs segundo o polimorfismo apresentado para 81 progênies.....	50

LISTA DE SUPLEMENTOS

Suplemento I.	Parâmetros dos testes estatísticos da Anova fator simples com três repetições por genótipos a partir dos grupos fenotípicos distintos formando classes com 12 indivíduos contrastantes para os teores de fibra e açúcares.....	58
Suplemento II.	Progênies com a identificação RB-UFRRJ (n), seguida dos prováveis genitores organizados segundo a estruturação do cluster do dendograma apresentado na figura 2.....	59
Suplemento III.	Valores de Escore Z para as oito combinações de primers ESTs-SSRs, indicando a fase de ligação gênica em atração ou repulsão com o fenótipo correspondente.....	60

LISTA DE ABREVIATURAS

RIDESA	Rede Interuniversitária para o desenvolvimento Sucroalcooleiro
SSR	<i>Simple sequence repeat</i>
gSSRs	Microssatélites Genômicos
ESTs	<i>Expressed Sequence Tags</i>
ESTs-SSR	<i>Expressed Sequence Tags-Simple Sequence Repeats</i>
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorfism</i>
SUCEST	BrazilianThe Sugarcane EST project
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
pb	Pares de base
QTLs	<i>Quantitative Trait loci</i>
SAM	Seleção Assistida por marcadores
TPH	Tonelada de pol por hectare
TCH	Tonelada de cana por hectare
TSH	Toneladas de sacarose por hectare
PCC	Pol% cana
MS	Matéria seca
Brix%	Teor de sólidos solúveis totais
AR	Açúcares redutores
ATR	Açúcares redutores totais
PBU	Peso do bagaço úmido
PIC	<i>Polymorphism Information Content</i>
IM	Índice de Marca
Cj	Probabilidade de Confundimento
Pj	Poder Discriminatório
UPGMA	<i>Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean)</i>
PP2C	Proteína fosfatase
PIP	Proteína intrínseca da membrana plasmática
CysP	Cisteína proteinase
1,4 βMEH	(1-4) β -manana endohidrolase
OFR	12-Oxofitodienoato redutase-3
PKL	Protein Kinase like
GAs	Giberilinas
AJ	Ácido jasmônico
CWIN	<i>Cell Wall Invertase</i>
SPS	Sacarose fosfato sintase
ACIN	Invertase ácida vacuolar
SPP	Sacarose fosfatase
SUSY	Sacarose sintase
MST	Transportadores monossacarídeos
DST	Transportadores dissacarídeos
PMGCA	Programa de Melhoramento Genético da Cana-de-açúcar
NTIN	Invertase citossólica
Pi	Fosfato inorgânico

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1	A Cana-de-Açúcar.....	3
2.1.1	A cultura da cana-de-açúcar e seus aspectos agronômicos.....	3
2.1.2	Aspectos econômicos da cultura da cana-de-açúcar.....	4
2.1.3	Aspectos de origem genética da cana-de-açúcar.....	5
2.1.4	Poliploidia na cana-de-açúcar.....	6
2.1.5	Duplicações genômicas em cana-de-açúcar.....	7
2.2	Melhoramento Genético da Cana-de-Açúcar.....	8
2.2.1	Programa de melhoramento da cana-de-açúcar desenvolvido pela RIDESA.....	9
2.3	Genética da Cana-de-Açúcar Associada ao Aumento da Produtividade.....	10
2.4	Aspectos Tecnológicos da Cana-de-Açúcar.....	11
2.4.1	As vias de síntese e acúmulo de sacarose.....	11
2.4.2	Fibras.....	14
2.4.2.1	Celulose e hemicelulose.....	14
2.4.2.2	Lignina.....	16
2.5	Genética Molecular Aplicada ao Melhoramento da Cana-de-Açúcar.....	16
2.5.1	O melhoramento assistido por marcadores moleculares na cana-de-açúcar.....	17
2.5.2	Marcadores microssatélites.....	18
2.5.3	O uso dos microssatélites genômicos e funcionais.....	18
2.6	Marcadores Moleculares ESTs-SSRs para Discriminação do Genótipo Associado ao Fenótipo.....	19
2.6.1	ESTs-SSRs discriminantes de genes potenciais controladores da biossíntese de sacarose e ou fibras.....	20
3	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	23
4	ARTIGO - Marcadores moleculares Ests-SSRs discriminantes para teor de sacarose e fibra em cana-de-açúcar.....	43
	RESUMO.....	43
	ABSTRACT.....	43
	INTRODUÇÃO.....	44

	MATERIAL E MÉTODOS.....	45
	RESULTADOS.....	47
	DISCUSSÃO.....	52
	CONCLUSÕES.....	53
	REFERÊNCIAS.....	54
	SUPLEMENTOS.....	57
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	66

1 INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil é um país expoente na produção mundial de cana-de-açúcar e de alguns de seus derivados, como o açúcar e o álcool. Na safra 2010/2011, o setor sucroenergético movimentou cerca de R\$ 60 bilhões de reais por ano, o que correspondeu a 1,6% do PIB nacional e 18% da matriz energética. É representado por 435 usinas e destilarias e gera aproximadamente 4,5 milhões de empregos diretos e indiretos no Brasil (PROCANA, 2012). Devido à expressividade desses números o agronegócio da cana-de-açúcar compõe-se de elos geradores de várias oportunidades de negócios e possui um futuro promissor no mercado mundial.

O contínuo desenvolvimento do setor sucroenergético depende da obtenção de novas variedades que atendam às necessidades do mercado e garantam o aumento do lucro às empresas do ramo. Os programas de melhoramento genético da cana-de-açúcar estão atentos às novas demandas e foram responsáveis pela mudança no perfil varietal dos clones atuais por meio de estratégias de cruzamento e seleção diferenciadas (LANDEL e SILVA, 2004; PALHARES, 2010).

A cana-de-açúcar é uma planta octaplóide, com 100 a 120 cromossomos distribuídos em 8 genomas básicos, o genoma monoplóide comporta a razão de 750 a 930 Mb e o conjunto poliplóide completo varia entre cultivares em aproximadamente 10 Gb (D'HONT et al., 2008). O alto nível de ploidia e a complexidade citogenética das espécies de *Saccharum*, envolvendo classes variadas de cromossomos e eventos de recombinação, torna a cultura mais complexa do ponto de vista genômico em que o melhoramento genético tem sido aplicado.

Um progresso no entendimento sobre a complexidade genética e genômica da cana-de-açúcar tem sido alcançado com o emprego de marcadores moleculares. A incorporação destes na seleção de características econômicas durante os primeiros estágios de melhoramento, assim como, na escolha de melhores parentais em um cruzamento, pode reduzir significativamente o tempo de desenvolvimento de novas variedades.

Dentre os marcadores moleculares disponíveis, destacam-se os microssatélites. São marcadores baseados em PCR, de alta reprodutibilidade e repetibilidade (QI et al., 2012). Apresentam alto poder discriminatório, muito polimórfico e de fácil metodologia (XU e CROUCH, 2008; CHEN et al., 2009). Para a obtenção dos *primers* dos gSSRs, o conhecimento das sequências de DNA é necessário e constitui-se num dos principais obstáculos (QI et al., 2012).

Os marcadores microssatélites que são obtidos a partir de sequências expressas (ESTs-SSR), são de fácil obtenção em razão da ampla disponibilidade de ESTs nos bancos de dados (SILVA et al., 2012), eliminando a necessidade do sequenciamento genômico (PINTO et al., 2004), ou do enriquecimento por bibliotecas de SSRs (CORDEIRO et al., 2001).

Os bancos de dados de sequências expressas (ESTs) permitem o desenvolvimento de marcadores microssatélites pela busca de sequências repetitivas (EST-SSRs), sendo a análise destes, uma estratégia simples para o estudo da porção expressa do genoma, ideal para genomas grandes, complexos e altamente redundantes, como a cana-de-açúcar (GARSMEUR et al., 2011). Os ESTs-SSRs permitem a análise da região transcrita do genoma facilitando a discriminação de sequências alvos como locos gênicos ligados a caracteres de interesse agrônomo, especialmente em plantas poliplóides (UKOSKIT et al., 2012). Além disso, os sítios de iniciadores são mais conservados, possibilitando a amplificação heteróloga entre espécies, aumentando seu valor em programas de melhoramento (FRASER et al., 2004). Os ESTs-SSRs podem ser aplicados no mapeamento de ligação baseando-se na associação do

genótipo/fenótipo (OLIVEIRA et al., 2007), assim como na detecção das múltiplas interações dos alelos com os fenótipos (FICKLIN et al., 2010).

Uma fonte para a identificação de novos marcadores ESTs-SSRs é o grande número de projetos abrangendo várias espécies vegetais que contém pelo menos 40 mil bibliotecas de ESTs depositadas no GenBank. A cana-de-açúcar gênero *Saccharum* é bem representada, com bibliotecas de ESTs de 24 espécies em 78 projetos. Destes, 55 são projetos para ESTs de cultivares comerciais (*Saccharum hybridum*). Dentre eles, o projeto brasileiro SUCEST (*Brazilian Sugarcane EST Project*), abordou o genoma funcional de *Saccharum hybridum* cultivar SP80-3280 com 135.543 sequências de ESTs e revelou *in silico* 552 sequências de ESTs-SSRs, potencialmente possíveis de aplicação direta nos programas de melhoramento genético (DIOLA et al., 2013).

Neste contexto, no sentido de explorar as informações contidas a partir de ESTs depositados no NCBI, desenvolveu-se neste presente estudo de marcadores moleculares do tipo microssatélites, visando aprofundar estudos relacionados aos genes que controlam características de importância agrônômica e industrial, como a produtividade sacarose e a qualidade de fibras em cana-de-açúcar.

A partir deste estudo, foi possível mostrar a eficiência dos ESTs-SSRs em detectar a associação do genótipo ao fenótipo. A estratégia utilizada aqui pode ser expandida para outras características alvos de interesse agrônômico cujo objetivo seja atender as demandas do melhoramento genético, na intenção de melhorar a eficiência de seleção e reduzir o tempo de obtenção de novas variedades de cana-de-açúcar.

O presente estudo teve como objetivo geral a obtenção de marcadores moleculares ESTs-SSRs robustos, discriminantes de múltiplos locos capazes de formarem agrupamentos genotípicos associados com fenótipos relacionados à produção de sacarose e fibras, características econômicas importantes para a integração nos programas de melhoramento da cana-de-açúcar.

Para alcançar esse objetivo, foram traçados os seguintes objetivos específicos:

- Caracterizar fenotipicamente materiais selecionados em fase T1 do melhoramento para a característica de sacarose e fibras.
- Caracterizar genotipicamente materiais genéticos com genitores contrastantes para os teores de sacarose e fibra.
- Analisar a associação genótipo fenótipo buscando a interação para as características relacionadas à sacarose e fibra.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A Cana-de-Açúcar

2.1.1 A cultura da cana-de-açúcar e seus aspectos agronômicos

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) pertence à família Poaceae e à classe Monocotiledônea. As principais espécies surgiram na Oceania (Nova Guiné) e na Ásia (Índia e China) e as variedades cultivadas no Brasil e no mundo são híbridos multiespecíficos. Foi melhorada por muitos séculos de cultivo, originada por uma série de cruzamentos interspecíficos entre *Saccharum officinarum* L. e *S. spontaneum* (L.), que são poliplóides. Este processo de introgressão providenciou o maior avanço no melhoramento da cana-de-açúcar, solucionando uma série de problemas relativos a doenças da cana e também providenciou benefícios adicionais, como aumento da colheita e adaptação a estresses abióticos (ROACH e DANIELS, 1987).

A parte aérea da planta é formada por colmos, folhas e inflorescências, enquanto a parte subterrânea por raízes e rizomas. As principais características dessa família são a inflorescência do tipo panícula, o crescimento do caule em colmos, as folhas com lâminas de sílica em suas bordas e a bainha aberta (FRANÇA e JASINSKI, 2007). É propagada de forma vegetativa, através de brotações das gemas laterais presentes nos nós dos colmos (SEGATO et al., 2006; CASAGRANDE, 2008).

O colmo, responsável pela sustentação das folhas e panículas, é dividido em nós e entrenós, sendo constituído em termos anatômicos de um cilindro sólido e fibroso, com espaços livres entre os tecidos vasculares ocupados por um parênquima com células ricas em carboidratos. O comprimento dos colmos pode chegar aos cinco metros, porém em alguns casos alcançam até seis metros (MONTE, 2004). A cicatriz foliar, anel de crescimento e a zona radicular são encontrados na região do nó.

A cultura realiza o ciclo fotossintético do tipo C4 e possui alta eficiência na conversão de energia solar em açúcar e fibras. É provavelmente uma das espécies vegetais que alcança maior eficiência energética (BRUNINI, 2008) convertendo quase 8% da energia solar captada em energia bioquímica (GOVINDJEE e GOVINDJEE, 2012). No decorrer do ciclo de crescimento e desenvolvimento, a cana-de-açúcar atravessa dois períodos distintos com relação ao teor de sacarose: o primeiro é assinalado por um intenso crescimento vegetativo acompanhado por uma gradual formação de sacarose, enquanto que no segundo ocorre um predominate acúmulo de sacarose, motivado pela escassez dos principais fatores de desenvolvimento vegetativo, como temperatura e água disponível.

De maneira geral, pode-se afirmar que a brotação, o perfilhamento e o crescimento são praticamente nulos em temperaturas abaixo de 20°C, e entre 25°C e 30°C são ótimos; acima de 35°C voltam a ser praticamente nulos. Na maturação, a temperatura média do ar deve ser menor que 20°C, ou seja, o desenvolvimento vegetativo é paralisado e a planta passa a elaborar mais sacarose que será acumulada como substância de reserva, elevando seus teores no colmo (ANDRADE e CARDOSO, 2004).

Para melhorar o rendimento em biomassa, aumentando a concentração de sacarose no colmo é necessário um conhecimento maior do metabolismo de sacarose, transporte e interações entre fonte-dreno que regulam o acúmulo de sacarose. Órgãos de fonte e dreno devem ser coordenadamente regulados pela expressão gênica e atividade enzimática de forma a produzir crescimento rápido e acúmulo de sacarose eficiente (CHAMBRA et al., 2011) como será visto posteriormente.

2.1.2 Aspectos econômicos da cultura da cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar tornou-se um dos produtos mais importantes do agronegócio brasileiro e, desde que foi introduzida pelos portugueses no século XVI destaca-se entre as principais culturas do Brasil (LUCCHESI, 2001). Com a criação do Programa Nacional do Alcool (Proalcool) em 1975, como estratégia para lidar com a crise do petróleo, a cana-de-açúcar vem mantendo uma forte participação na economia nacional. A partir desse momento, os programas de melhoramento investiram em tecnologias de ponta, aplicados tanto na agricultura como na indústria, tornando a cana-de-açúcar uma cultura bem estabelecida no Brasil (MATSUOKA et al., 2009). É cultivada em todo o território, estando a produção concentrada no Centro-Sul e Nordeste o que confere ao Brasil a possibilidade de produzir e abastecer o mercado com açúcar e álcool ao longo de todo o ano. A região Sudeste é a maior produtora, com mais de 60% da área total plantada, seguida pela região Centro-Oeste, com 15% e Nordeste, com 14% da área total (CONAB, 2011).

De acordo com informações da Companhia Nacional do Abastecimento (CONAB), a produção brasileira de cana-de-açúcar na safra 2011/2012 foi de 588,915 milhões de toneladas, numa área cultivada de 8.434,3 mil hectares e produtividade média de 69.824 kg/ha, 9,8% menor que a da safra 2010/11, que foi de 77.446 kg/há (CONAB, 2011). A diminuição da produtividade nesta safra está ligada a diversos fatores como a estiagem ocorrida de abril a outubro de 2010, a escassez de chuvas no mês de maio de 2011, a ocorrência de geadas em São Paulo, Mato Grosso do Sul, e Paraná e o florescimento em excesso de boa parte da lavoura, proporcionando a maior queda da produtividade dos últimos anos. Na mesma safra, o Brasil alcançou produção total de açúcar de 37,06 milhões de toneladas e cerca de 27,09 bilhões de litros de etanol. A cultura responde por 44% do comércio mundial de açúcar, sendo o total de cana destinado à produção de açúcar estimado em 308,88 milhões de toneladas.

Apesar da indiscutível relevância da produção de açúcar, o principal responsável pela projeção do setor sucroalcooleiro recentemente é o etanol, uma fonte de energia mais limpa e que figura como principal alternativa ao petróleo e seus derivados. O país compete com os Estados Unidos a liderança na produção mundial. A exportação brasileira de etanol para os Estados Unidos foi de 1,14 bilhão de litros em 2011, representando 96,7% do total de etanol importado pelo Brasil no referido ano, de acordo com dados da Secretaria de Comércio Exterior (Secex) do Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior (MDIC). A quantidade é recorde e muito superior aos 74 milhões de litros importados em 2010 (AUTOMOTIVE BUSINESS, 2013). Tal aumento foi impulsionado pelos prêmios pagos pelos EUA para o etanol avançado, categoria em que o etanol de cana-de-açúcar está incluído, por ter ciclo de emissões reduzidas em relação ao álcool de milho, graças ao maior aproveitamento da biomassa no processo industrial, à maior produtividade da cana e reabsorção de CO₂ nas plantações.

Os variados usos possíveis da cana-de-açúcar como matéria-prima têm gerado aumento do interesse de produtores de vários países pela cultura (LAM et al., 2009). A cultura canavieira pode ser utilizada como forragem animal, matéria-prima para aguardente e para processos industriais de produção de ácido acético, butanol, papel, madeira compensada e enzimas industriais (ARENCIBIA, 1998; CIDADE et al., 2006). Além disso, gera a partir dos seus resíduos, o etanol de segunda geração convertido em biocombustível, energia elétrica e eteno, uma matéria prima do polietileno para produção de plásticos (UNICA, 2012).

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) é realmente uma cultura de significativa importância econômica, com previsão de alcançar uma taxa média de aumento na produção de açúcar de 3,25%, até 2018/19, para um total de 47,34 milhões de toneladas do produto.

Para as exportações, o volume previsto para 2019 é de 32,6 milhões de toneladas (MAPA, 2012).

2.1.3 Aspectos de origem genética da cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar é uma planta alógama (WALKER, 1987), com uma taxa de autofecundação que varia de 2,8 a 17,6% (BARBOSA et al., 2005). Pertence a família Poaceae (Gramineae), tribo Andropogoneae e gênero *Saccharum*, com seis espécies conhecidas entre as quais se distinguem duas categorias: (1) as espécies selvagens: *S. robustum* Brandes e Jesweit ex Grassl e *S. spontaneum* L. e (2) as espécies domesticadas: *S. officinarum* L., *S. barberi* Jesw., *S. sinense* Roxb. e *S. edule* Hassk (NAIDU e SREENIVASAN, 1987; ROACH e DANIELS, 1987; MATSUOKA et al., 2005).

O processo evolutivo que originou as espécies de cana-de-açúcar vem sendo mais bem definido com estudos moleculares e citogenéticos realizados nas últimas décadas. Tais estudos reduzem a possibilidade de contribuição dos gêneros *Erianthus* e *Miscanthus* para a origem das espécies de cana (GLASZMANN et al., 1989; 1990; D'HONT et al., 1993; LU et al., 1994; D'HONT et al., 1995; BESSE et al., 1997; ALIX et al., 1998; 1999; D'HONT et al., 2002). A cana evoluiu a partir de uma linhagem ancestral comum pertencente exclusivamente ao gênero *Saccharum* (GRIVET et al., 2004). A maioria dos autores diverge quanto ao local exato onde se iniciou o seu cultivo (GOMES e LIMA, 1964; ETHIRAJAN, 1987; CESNIK e MIOCQUE, 2004; RIPOLI et al., 2007). A cana-de-açúcar provavelmente é originária das regiões da Indonésia e Nova Guiné e foi melhorada por muitos séculos de cultivo, originada por uma série de cruzamentos interespecíficos entre *S. officinarum* e *S. spontaneum* (D'HONT et al., 2008).

A espécie *S. officinarum* ($2n=80$) compreende as chamadas canas nobres ou canas tropicais, caracterizadas pelos seus altos teores de sacarose, porte elevado, colmos grossos, pouco teor de fibra, considerada um alopólíploide e uma das principais espécies que contribuíram com genes para as cultivares cultivadas atualmente no mundo, sendo espécie-base dos programas de melhoramento (MING et al., 1998).

Por sua vez, *S. spontaneum* ($2n = 40-128$) apresenta plantas de colmos curtos e finos, fibrosos, praticamente sem açúcar, sistema radicular bem desenvolvido, perfilhamento vigoroso e abundante. São plantas muito rústicas, vegetando bem nas mais diversas condições de solo e clima; apresenta resistência a condições adversas, oferecendo grande contribuição ao melhoramento. Esta espécie tem ampla distribuição geográfica, podendo ser encontrada do Japão à Nova Guiné e do Mediterrâneo à África (MURKHERJEE, 1957).

Em razão da origem de cruzamento interespecífico entre *S. officinarum* e *S. spontaneum*, o genoma sofreu sucessivas duplicações, apresentando elevada poliploidia (octaplóide), com 100 a 120 cromossomos distribuídos em 8 genomas básicos, contendo o genoma monoplóide a razão de 750 a 930 Mb e o conjunto completo variando entre cultivares para aproximadamente 10 Gb (D'HONT et al., 2008). O genoma monoplóide é comparável ao do sorgo (~760 Mb) e duas vezes o do arroz (~430 Mb) (D'HONT e GLASZMANN, 2001).

A confirmação de que o genoma dos híbridos modernos é composto pela reunião dos genomas das espécies *S. officinarum* e *S. espontaneum*, com a predominância de *S. officinarum* inclui estudos de hibridização *in situ* (PIPERIDIS e D'HONT, 2001). Variedades cultivadas submetidas a estes estudos apresentaram de 10 a 20% de cromossomos de *S. spontaneum*. Com o mapeamento genético, Grivet et al (1996) e Hoarau et al. (2001), demonstraram a ocorrência de recombinações entre cromossomos dos dois parentais (5% a

17% de cromossomos recombinantes) e os demais são de *S. officinarum* (PIPERIDIS e D'HONT, 2001; D'HONT, 2005).

No genoma dessas cultivares evidencia-se a coexistência de duas organizações cromossômicas distintas, devido às diferenças no número básico de cromossomos de *S. officinarum* e *S. spontaneum* (D'HONT et al., 1996). Hibridização fluorescente *in situ* (FISH) e genes rDNA indicaram que os 80 cromossomos de *S. officinarum* se encontram organizados em 8 cópias homólogas, de um conjunto básico de 10 cromossomos diferentes ($2n = 10x = 80$), enquanto que os 40 a 128 cromossomos de *S. spontaneum* estão organizados em 5 a 12 cópias homólogas, com conjunto básico de 8 cromossomos diferentes ($2n = 8x = 40-128$) (D'HONT et al., 1998; HA et al., 1999). Assim, nos híbridos interespecíficos cromossomos homólogos coexistem, apresentando diferenças na organização estrutural (D'HONT et al., 1996; GRIVET et al., 1996). A estrutura da cultivar moderna R570, atualmente tomada como referência, está representada na figura 1.

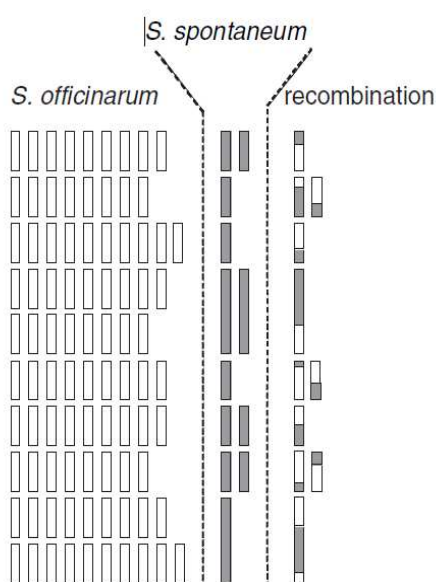


Figura 1: Representação esquemática do genoma da variedade R570. O genoma é derivado da hibridação interespecífica entre *S. officinarum* ($2n = 8x = 80$) e *S. spontaneum* ($2n = 5x$ a $16x = 40$ a 128). 10% a 20% dos seus cromossomos são herdados de *S. spontaneum* (barras cinzas), 70% a 80% são herdados de *S. officinarum* (barras brancas) e cerca de 10% são o resultado de recombinação entre cromossomos das duas espécies ancestrais. Fonte: D'HONT et al. (2008).

Nesse contexto, considera-se a cana-de-açúcar como uma das espécies cultivadas de maior complexidade genética. Existe um crescente empenho em estudar seu genoma e usar essas informações em programas de melhoramento.

2.1.4 Poliploidia na cana-de-açúcar

Hieter e Griffiths (1999) estimaram que cerca de 50% das espécies vegetais de interesse são poliplóides, como é o caso da cana-de-açúcar. Os poliplóides caracterizam-se pela presença de vários cromossomos por grupo de hom(e)ologia (GRIFFITHS et al., 2004). Se o número de cromossomos nas células somáticas é um múltiplo do número básico da espécie é dita euplóide, caso contrário, a planta é aneuplóide. Os inúmeros aspectos da poliploidia podem ser consultados em trabalhos de vários autores (STEBBINS, 1971; LEWIS,

1980; LEITCH e BENNET, 1997; RAMSEY e SCHEMSKE 1998, 2002; SOLTIS e SOLTIS, 1999; OTTO e WHITTON, 2000; WENDEL, 2000; WOLFE, 2001, entre outros).

Classicamente, poliplóides podem ser divididos em autopoliplóides, originados pela duplicação de um mesmo genoma, e alopoliplóides, originados pela duplicação de genomas diferentes, normalmente após um evento de hibridação. No estudo de marcadores mendelianos em poliplóides, além da origem filogenética deve-se considerar também o comportamento dos cromossomos no momento da meiose, uma vez que casos distintos podem ocorrer. Um exemplo seria a formação de bivalentes e segregação dissômica que compreende principalmente os alopoliplóides. Outro caso seria a formação de bivalentes e segregação polissômica, na qual os cromossomos se pareiam ao acaso dentro de uma classe de homologia, compreendendo principalmente os autopoliplóides e eventualmente alguns alopoliplóides. E por último, a formação de multivalentes, onde os cromossomos homólogos se pareiam todos juntos dentro de uma mesma classe de homologia, sendo identificado principalmente nos autopoliplóides, podendo ocorrer em alguns alopoliplóides (STEBBINS, 1971; SYBENGA, 1992; JANNOO, 1998).

Jackson (1982) concluiu que o comportamento genético em poliplóides é bastante complexo, particularmente dentro das gramíneas. As variedades cultivadas (*Saccharum hybridum*) apresentam elevada complexidade genética, pois são derivadas de eventos de auto e alopoliploidia (CASU et al., 2005). O pareamento dos cromossomos durante a meiose é difícil de ser interpretado nessas variedades, uma vez que os mesmos podem ter afinidade com seu próprio par ou com seus homeólogos, formando univalentes, bivalentes ou multivalentes. Isso afeta diretamente o padrão de segregação e, conseqüentemente, induz à variações ao número total de cromossomos transmitidos.

Muito esforço tem sido feito no estudo a respeito dos tipos de formação e comportamento dos cromossomos nas plantas de cana-de-açúcar. Para uma melhor compreensão ver Sreenivasan e Jagathesan (1975), D'Hont et al. (1996), Grivet et al. (1996), Al-Janabi et al. (1994), Ming et al. (1998) e Hoarau et al. (2001). Todas as espécies do gênero *Saccharum* apresentam natureza poliplóide e não apresentam nenhuma espécie diplóide aparentada conhecida, sendo as espécies aneuplóides as mais frequentes. Porém, a constituição genômica da cana-de-açúcar ainda não é completamente entendida. Com o avanço das técnicas de biotecnologia, espera-se alcançar mais conhecimento dos mecanismos meióticos destas plantas e assim determinar o comportamento dos cromossomos, suas associações e tipos de segregação.

2.1.5 Duplicações genômicas em cana-de-açúcar

Ao levarmos em consideração as dificuldades de se trabalhar com organismos complexos como a cana-de-açúcar, mais uma questão deve ser considerada, o que torna ainda mais complicado o estudo com os poliplóides, que é a detecção de polimorfismo usando marcadores moleculares cuja análise sempre é realizada segundo a presença ou ausência da amplificação, não sendo possível a detecção de co-dominância, a exemplo os microssatélites (GRIFFITHS et al., 2002; DECROOCQ et al., 2003; EUJAYL et al., 2004). Quando se trata de organismos poliplóides, a complexidade envolvida no uso de marcadores co-dominantes aumenta. A grande quantidade de fragmentos gerados, que podem representar os diferentes alelos do mesmo loco nos vários cromossomos homólogos envolvidos, não permite identificação dos genótipos pelo fenótipo visualizado (OLIVEIRA, 2006).

Na busca pela superação de tal dificuldade, muitos estudos foram realizados. Um exemplo seria a metodologia proposta por Wu et al. (1992), em que é considerado o pareamento de bivalentes na meiose. Muitos locos, contendo genes ou não, sofreram

duplicações sucessivas, o que amplia significativamente a variabilidade genética (BUTTERFIELD et al., 2001) e consequentemente estudos de herdabilidade e ligação gênica são sensivelmente afetados (MCINTYRE et al., 2006).

O processo de recombinação genética na meiose e o emparelhamento cromossômico da primeira mitose são momento que duplicações de regiões cromossômicas podem ocorrer, gerando sequências repetidas dentro do mesmo cromossomo (WU et al., 1992). Consequentemente, os genes e alelos contidos neste loco aumentam sua frequência no genoma. Em alguns casos muitas variações alélicas podem ser incorporadas nestas regiões, ampliando a variabilidade genética em razão do aparecimento de muitos alelos. O projeto The Arabidopsis Genome Initiative (2000) mostrou que a frequência de genes duplicados em *Arabidopsis* foi de 65%. Em cana de açúcar, ainda não se dispõe destas informações, mas Wang et al. (2010), sequenciaram 20 clones BAC da cultivar R570 e construíram um mapa de microcolinearidade com sorgo e identificaram 26 eventos de duplicação genômica em ~2,5Mb. Quando se trata da duplicação gênica, seguida ou não de variabilidade genética, a dose gênica de alelos específicos produz um efeito considerável sobre a expressão fenotípica. Na maioria dos casos o fenótipo é amplamente variável, pois é controlado por alelos específicos ou por uma parcela destes locos e não pelo conjunto total dos alelos, como evidenciado por Diola et al. (*no prelo*) ao estudar marcadores moleculares ESTs-SSRs associados ao fenótipo em cana-de-açúcar.

2.2 Melhoramento Genético da Cana-de-Açúcar

Um dos principais objetivos de um programa de melhoramento de cana-de-açúcar é lançar novos cultivares que sejam mais rentáveis aos produtores, aumentando a produtividade e reduzindo as perdas econômicas, por um intervalo de tempo maior. Sendo assim, a característica mais importante seria a elevada produção de açúcar por unidade de área, mensurado em toneladas de pol por hectare (TPH). Os componentes envolvidos para a maximização desta característica são a tonelada de cana por hectare (TCH) e o teor de açúcar da cana (PCC – pol % cana). Ambos são considerados de igual importância, sendo que para se estimar a tonelada de cana, devem ser considerados ainda os componentes de rendimento: número de colmos por hectare e massa de colmo, sendo este último composto por componentes secundários como diâmetro, estatura e densidade de colmos (ALMEIDA, 2010).

Outras características de importância para um genótipo de cana-de-açúcar referem-se à rápida brotação, vigorosa e prolongada sobrevida das soqueiras, a tolerância à seca e ao frio, o hábito de crescimento ereto e a ausência de florescimento e chochamento dos colmos, e com estabilidade e adaptabilidades aos diferentes ambientes de cultivo. Ter ainda, boa adaptabilidade para a colheita mecânica. Ser resistente e/ou tolerante às principais doenças e pragas que incidem sobre a cultura (BRESSIANI, 2001; MATSUOKA et. al., 2005).

Atualmente, o Brasil se encontra entre os pioneiros na obtenção de cultivares de cana-de-açúcar de valor comercial, sendo estes desenvolvidos por quatro principais programas: 1) Programa Cana do Instituto Agrônomo de Campinas – IAC (<http://www.iac.sp.gov.br>) iniciado em 1933; 2) Centro de Tecnologia Canavieira – CTC ([www://ctc.com.br](http://www.ctc.com.br)) que iniciou seus trabalhos em 1968, extinta COPERSUCAR; 3) Programa de Melhoramento Genético da Cana-de-açúcar da RIDESA - Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroalcooleiro, formado por Universidades Federais e com início em 1971 como PLANALSUCAR; 4) Canavialis, que iniciou suas atividades em 2004, sendo adquirido pela Monsanto em 2008.

Em geral, um programa convencional de melhoramento genético em cana-de-açúcar leva um tempo relativamente longo para obtenção e distribuição de uma nova variedade aos produtores, aproximadamente de 12 a 15 anos (BURNQUIST, 2000). Estes clones são selecionados a partir de populações derivadas de cruzamentos entre dois clones elites (cruzamentos bi-parentais) ou mais (policruzamentos). A maioria das características consideradas na seleção é de natureza quantitativa e controladas por muitos locos (QTL's), tais como teor de sólidos solúveis, teor de sacarose, diâmetro e número de colmos, teor de fibras, resistência ao acamamento e florescimento, precocidade, resistência a pragas e doenças, etc. (OLIVEIRA, 2006). Os clones são propagados de forma vegetativa e avaliados em sucessivos ensaios durante as várias etapas do programa de melhoramento antes de serem liberados como cultivar (CALIJA et al., 2001).

O contínuo desenvolvimento do setor sucroenergético depende da obtenção de novas variedades que atendam às necessidades do mercado e garantam a competitividade do setor. São os programas de melhoramento genético da cana-de-açúcar que atentos às novas demandas, têm sido responsáveis pela mudança no perfil varietal dos clones atuais por meio de estratégias de cruzamento e seleção diferenciadas (LANDEL e SILVA, 2004).

2.2.1 Programa de melhoramento da cana-de-açúcar desenvolvido pela RIDESA

No Brasil, um dos programas de melhoramento que se destaca foi criado em 1972, o Programa Nacional de Melhoramento da Cana-de-açúcar (PLANALSUCAR), o qual após sua extinção em 1990, passou a ser conduzido pelas Universidades Federais que compõe a Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroalcooleiro (RIDESA). Atualmente a Ridesa é formada pelas seguintes universidades: UFPR, UFSCar, UFV, UFRRJ, UFS, UFAL, UFRPE, UFG e UFMT.

O Programa de Melhoramento da RIDESA apresenta parceria com usinas e destilarias, as quais participam do desenvolvimento de cultivares desde as etapas iniciais do programa BARBOSA et al. (2005). O processo de desenvolvimento de novas cultivares envolve o que se convencionou denominar de fases T1, T2, T3, FE e FM, ou seja, primeira, segunda e terceira fases de teste, fase experimental e fase de multiplicação clonal, respectivamente. Uma descrição mais detalhada de cada fase pode ser encontrada em (MATSUOKA et al., 2005; BARBOSA e SILVEIRA, 2010).

Esse trabalho de parceria permite ao produtor e ao melhorista definir a melhor estratégia de manejo para os novos cultivares desenvolvidos. Os cultivares de sigla RB, anteriormente desenvolvidos pelo PLANALSUCAR, e atualmente pela RIDESA, estão sendo cultivados em mais de 62% da área plantada com cana-de-açúcar no país, chegando em algumas regiões a percentuais superiores (RIDESA, 2012).

Com o apoio de parte significativa do Setor Sucroalcooleiro, por meio de convênio, a REDE começou a desempenhar suas funções em 1991, aproveitando a capacitação dos pesquisadores e as bases regionais do ex-PLANALSUCAR, aos quais se juntaram professores das universidades (RIDESA, 2013). De fato, a Ridesa vem cumprindo importante papel no desenvolvimento da agroindústria canavieira nestes 22 anos de atuação, as universidades federais deram maior ênfase à manutenção e continuidade da pesquisa relacionada ao Programa de Melhoramento Genético da Cana-de-Açúcar (PMGCA) tendo liberado até o presente momento 78 cultivares (RIDESA, 2012). Os cruzamentos realizados na Estação de Floração e Cruzamento localizado na Serra do Ouro, em Murici, AL, reúnem mais de 2000 genótipos, entre cultivares utilizadas no país, clones, outras espécies relacionadas ao gênero *Saccharum* e cultivares importadas das diferentes regiões (BARBOSA et al., 2005).

2.3 Genética da Cana-de-Açúcar Associada ao Aumento da Produtividade

Programas de melhoramento conduzidos em diferentes partes do mundo têm desenvolvido continuamente novos cultivares mais produtivos, tolerantes ao estresse hídrico e adaptado às diferentes condições edafoclimáticas, além de resistentes a diversas doenças e pragas. Um dos desafios atualmente é aumentar o potencial da cana em acumular açúcares no colmo sem que haja perdas destas características favoráveis (JACKSON, 2005; WU e BIRK, 2007). Nesse sentido, é exigido esforço dos programas de melhoramento genético e convencional e da pesquisa agrônômica para o aumento da produtividade de cana e de açúcar para se chegar ao alto nível, com principal foco na produção de açúcar por hectare (TPH).

Tal componente depende da produtividade em termos de toneladas de cana por hectare (TCH) e da quantidade de açúcar da cultivar (POL). Ambos são considerados de igual importância, sendo que para se estimar a tonelada de cana, devem ser considerados ainda os componentes de rendimento: número de colmos por hectare e massa de colmo, sendo este último composto por componentes secundários como diâmetro, estatura e densidade de colmos. Outros parâmetros importantes para indicar a qualidade da cana-de-açúcar são os tecnológicos como Brix%, Pol%Cana e Fibra (CONSECANA, 2000).

O melhoramento convencional foi o que mais contribuiu para o aumento da produção de sacarose por unidade de área plantada. Porém, mesmo sendo bastante utilizados, os programas de melhoramento de cana estão abaixo das taxas de incremento de produção alcançados pelas grandes culturas, como milho, arroz e trigo (GROF et al., 2007). O constante cruzamento entre as espécies de *Saccharum* disponíveis nos bancos de germoplasma é apontado como a principal causa da estagnação no incremento de produtividade, resultado dos programas de melhoramento terem maximizado o teor de açúcar no colmo da cana (GROF e CAMBEL, 2001; JACKSON, 2005).

Essa busca constante por elevado teor de sacarose, o que significa recorrência para *S. officinarum*, torna a planta menos rústica, assim impondo também um limite agrônômico. Dessa forma, nos híbridos modernos sempre atuaram inversamente ao alto conteúdo de sacarose e a alta produtividade de colmos, pois o ganho de produtividade final de sacarose ocorre mais pelo ganho de biomassa do que pelo teor de sacarose (JACKSON, 2005). Muitas análises têm sido feitas considerando que se chegou a um patamar difícil de ser suplantado se consideradas as atuais condições de manejo agrônômico (MOORE, 2005), especialmente porque parece ocorrer um limite difícil de ser suplantado na partição do assimilado entre acúmulo de sacarose e crescimento.

Nesse contexto, trabalhos têm sido desenvolvidos para aprofundar no conhecimento dos genes que regulam os processos de síntese, transporte e acúmulo de sacarose (ZHU et al., 2000; MOORE, 2005; MING et al., 2006). Porém, outros estudos vêm sugerindo um novo modelo para o melhoramento de cana direcionado para alta produtividade de fibra ao invés de sacarose (GIAMALVA et al., 1984; ALEXANDER, 1985; GRAVOIS e MILLIGAN, 1992; HILL et al., 2006; JOHNSON et al., 2007) indicando que os benefícios serão maiores, uma vez que o aumento em produtividade de biomassa será maior e com dispêndio menor em esforços e recursos.

A cana-energia oferece uma oportunidade para o país aumentar mais ainda a sua competitividade em matéria de energia renovável de biomassa. Aumentos substanciais na produtividade de cana são esperados como resultados da aplicação da biotecnologia num futuro muito próximo. As cultivares transgênicas poderá desempenhar um papel chave para os

produtores trazendo maiores produtividades e cultivares mais resistente (CHEAVEGATTI-GIANOTTO et al., 2011).

2.4 Aspectos Tecnológicos da Cana-de-Açúcar

A parte morfológica da cana-de-açúcar de interesse comercial é o colmo. Sua composição química é bastante variável em função de diversos fatores como: variedade da cultura; idade fisiológica, condições climáticas durante o desenvolvimento e maturação, propriedades físicas, químicas e microbiológicas do solo, tipo de cultivo entre outros (PARANHOS, 1987; MARQUES et al., 2001).

Sob o aspecto tecnológico, os colmos são constituídos de caldo e fibra (sólidos insolúveis em água, compostos principalmente por lignina e celulose). O caldo contém água e os sólidos totais (açúcares e não açúcares) representados pelo teor de sacarose ou pelo Brix. Outros compostos não-açúcares como aminoácidos, gorduras, ceras, pigmentos e diversos minerais também compõe o caldo absoluto, entretanto, de forma bastante reduzida. Basicamente, o caldo possui em sua composição os açúcares solúveis sacarose, glicose e frutose. Destes, o mais valioso é a sacarose, pois dela pode-se obter os dois produtos de maior exploração, o açúcar e o álcool etílico.

2.4.1 As vias de síntese e acúmulo de sacarose

A sacarose é a principal forma de carboidrato translocado através da planta pelo floema (TAIZ e ZEIGER, 2004). É um dissacarídeo não redutor constituído por dois monossacarídeos (D-glicose e D-frutose). Os dois monômeros são ligados entre o C1 e o C2 da unidade glicosil e o C2 da unidade frutosil, numa ligação denominada de glicosídica (figura 2). Pode ser obtida abundantemente a partir de duas fontes naturais: beterraba (*Beta vulgaris*) e cana-de-açúcar (*Sacharum officinarum*), sendo esta última responsável por 60-70% da produção mundial de sacarose (LICHTENTHALER e PETERS, 2004).

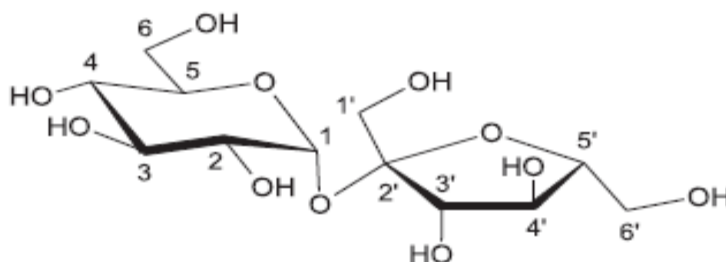


Figura 2: Estrutura química da sacarose formada pela dimerização dos monossacarídeos frutose + glicose. Fonte: BOSCOLO (2003).

As trioses fosfatases sintetizadas por atividade fotossintética são armazenadas como amido transitório nos cloroplastos ou convertidos em sacarose no citoplasma através de uma série de reações enzimáticas desencadeadas pela Frutose 1-6 Bisfosfatase, UDP- glicose pirofosforilase, Sacarose Fosfato Sintase e Sacarose Fosfatase (ROLLAND et al., 2006). A sacarose é então armazenada nos vacúolos, ou clivada em glicose e frutose por invertases, ou UDP-glicose e frutose pela sacarose sintase (KOCH, 2004).

A síntese de sacarose e a de amido são processos competitivos que se estabelecem nas folhas da cana-de-açúcar. A síntese de amido pode funcionar como um dreno transitório para acomodar o excesso de fotoassimilados que não podem ser convertidos em sacarose e exportados. Tanto a sacarose como o amido são sintetizados a partir da triose fosfato (gerada pelo ciclo de Calvin) via frutose-1,6-bifosfato e glicose-1-fosfato, sendo que as condições que promovem um deles, inibem a do outro. Os componentes-chave que regulam sua partição, envolvem as concentrações relativas de ortofosfato (Pi) e de triose fosfato no citosol (síntese de sacarose) e no cloroplasto (síntese de amido), além da concentração de frutose 2,6-bifosfato no citosol (LEITE, 2005). Quando a concentração de Pi citosólico é alta, a triose fosfato do cloroplasto é exportada para o citosol por meio de transportador de Pi e, em troca de Pi, a sacarose é sintetizada. Porém, quando a concentração citosólica de Pi é baixa, a triose fosfato é retida dentro do cloroplasto, e uma reserva estável e insolúvel de carboidratos (amido) é sintetizado (DIOLA e SANTOS, 2012).

As enzimas envolvidas diretamente na síntese de sacarose são; sacarose fosfato sintase (SPS; EC 2.4.1.14), sacarose fosfatase (SPP; EC 3.1.3.24) e sacarose sintase (SUSY; EC 2.4.1.13). Na síntese de sacarose, a glicose-1-fosfato é convertida a UDP-glicose por intermédio de uma UDP-glicose-fosforilase específica (SUNG et al., 1989).

As enzimas SPS e SPP existem como um complexo supramacromolecular, apresentando atividade enzimática maior do que as atividades isoladas das enzimas constituintes (DIOLA e SANTOS, 2012).

A SPS, por exemplo, é uma enzima alostérica ativada pela glicose-6-fosfato e inibida pelo ortofosfato, que catalisa a reação reversível: $\text{UDP-glicose} + \text{frutose 6-fosfato} \xleftarrow{\text{SPS}} \text{sacarose 6-fosfato} + \text{UDP} + \text{H}^+$. Com a retirada do fosfato da molécula de sacarose 6-P pela ação da SPS, faz com que a concentração de sacarose P seja mantida baixa, levando ao deslocamento do equilíbrio da reação para a direita dando um caráter irreversível a reação (HUBER e HUBER, 1996). O gene da SPS apresenta papel fundamental no processo de síntese e acúmulo de sacarose nos internós em processo de maturação (MOORE, 1995; BOTHA e BLACK, 2000; VERMA et al., 2011; BOARETTO, 2012).

A SPP tem como função no parênquima do colmo de retirar a molécula de fosfato da sacarose 6-P, produto gerado pela ação da SPS (UYS et al., 2007).

A SUSY catalisa a reação reversível: $\text{sacarose} + \text{UDP} \xleftarrow{\text{SUSY}} \text{frutose} + \text{UDP-glicose}$. No colmo da cana-de-açúcar, foram citados pelo menos três isoformas distintas da SUSY, com diferentes envolvimentos fisiológicos (SCHÄFER et al., 2005). A colaboração da SUSY no acúmulo de sacarose é precisamente exercer seu papel catalítico no citosol das células do parênquima e conservar a concentração de sacarose em baixos níveis (AVIGAD, 1982). A alta atividade da SUSY ocorre principalmente nas folhas em formação e nos internódios do colmo, ou seja, nos tecidos dreno (SCHÄFER et al., 2004).

Após sua síntese, a sacarose pode ser transportada das células do mesófilo até as células companheiras (CC), localizadas no simplasto, movendo-se de célula por célula via plasmodesmatas (conhecido como carregamento simplástico) envolvendo um transportador de sacarose, que atua em associação com o transporte de potássio, dependente de energia metabólica. Porém, ela também pode ser carregada ativamente do apoplasto para as CC (conhecido como carregamento apoplástico). Para tal processo é fundamental o papel dos transportadores de açúcar. O descarregamento da sacarose nos tecidos drenos também pode ocorrer tanto simplasto quanto apoplasticamente. A escolha de rota depende da espécie, do órgão, do tecido e do estágio de desenvolvimento da planta. As células dreno podem importar a sacarose diretamente do apoplasto, via transportadores dissacarídeos (DST); ou alternativamente a sacarose pode ser hidrolisada em glicose e frutose pelas enzimas

invertases, para então ser importada via transportadores monossacarídeos (MST) (WILLIAMS et al., 2000; BUTTNER e SAUER, 2000).

As enzimas envolvidas na quebra de sacarose são; a invertase ácida solúvel, a invertase neutra e a sacarose sintase (KOMOR, 2000). As principais isoformas da enzima invertase em plantas superiores podem ser diferenciadas de acordo com sua localização (parede celular, vacúolo e citosol) através da solubilidade (solúvel ou insolúvel) e pH ótimo (ácido ou neutro/alcalino). Destacam-se três: a invertase ácida solúvel – CWIN (*Cell Wall Invertase*, ligada à parede celular; pH ótimo 4,0 -4,5; insolúvel; glicosilada), invertase ácida vacuolar – ACIN (pH ótimo 4,0-4,5; insolúvel; glicosídica) e invertase citossólica – NTIN (pH ótimo 7,0-7,8; solúvel; não-glicosilada) (STRUM e CHRISPEELS, 1990). As invertases podem estar envolvidas no transporte de sacarose a longas distâncias por criar um gradiente de concentração de sacarose entre os sítios de carregamento e descarregamento do floema, revelando função fundamental na partição dos fotossintetizados entre armazenamento e crescimento (ESCHRICH, 1980).

As invertases ao quebrar a sacarose em hexoses disponibilizam às células carbono e energia para o processo de respiração, bem como energia para a síntese de numerosos compostos diferenciados. Sempre que a concentração de sacarose no apoplasto atingir níveis incompatíveis com o funcionamento dos transportadores de sacarose, a enzima invertase ácida, presente na parede celular, é ativada, atuando na reação de hidrólise e transformando sacarose em hexoses. As hexoses entram no citoplasma das células do parênquima do colmo, por um processo de difusão. No citoplasma, as reações são mais complexas, porque as hexoses são muito reativas e sofrem rápidas interconversões e fosforilações. Várias enzimas participam dessas reações, como: hexoquinases (fosforilação da glicose e frutose); fosfohexose-isomerase (interconversão de glicose-6-P e frutose-6-P), UDPG frutose-6-P transglicosidase (síntese de sacarose e sacarose-P), numerosas fosfatases não específicas e uma sacarose-P, além de auxinas que controlam o sistema. Essas hexoses são transportadas de volta às células do mesófilo, sendo novamente convertidas em sacarose (DIOLA e SANTOS, 2012).

A etapa ativa do acúmulo ocorre através da quebra da ligação fosfato da sacarose-P e a consequente liberação de energia, que envolve o transporte ativo de sacarose-P para o interior da célula. Isso não ocorre com a sacarose devido a sua concentração no interior da célula ser maior em relação ao meio externo, nesse caso transporte é passivo. Quando no interior do vacúolo, efetivamente a sacarose é armazenada (RODRIGUES, 1995). A acumulação nos vacúolos contribui para manter a força dreno do colmo, resultando em extraordinária produção de sacarose neste tecido.

Devido a sua capacidade única de estocar sacarose em seus entrenós, a cana-de-açúcar tornou-se uma importante fonte de informação no que se diz respeito à síntese de sacarose, seu transporte e acúmulo. Muito esforço tem sido direcionado na busca por esse conhecimento (ZHU et al., 1997; LINGLE, 2004; MOORE, 2005; RAE et al., 2005). Durante a maturação, a cana-de-açúcar armazena a sacarose pronunciadamente da base para o ápice do colmo. Para isso, há declínio na atividade da invertase ácida dos espaços intercelulares (apoplasto), baixa atividade de invertase ácida do citoplasma e atividade quase nula de invertase ácida vacuolar (CASAGRANDE, 1991). No início, o terço basal do colmo mostra teor mais elevado de açúcar do que o terço médio e, este, maior teor do que o terço apical. À medida que o processo de maturação se intensifica, o teor de sacarose tende a se igualar nas diversas partes dos colmos, quando o ápice apresenta composição similar à da base. Somente os entrenós imaturos das folhas verdes e os entrenós superamadurecidos da base (com alto teor de fibra), não retêm apreciável quantidade de açúcar (FERNANDES, 1982).

2.4.2 Fibras

São polímeros de glicose de formas alongadas e afiladas, que fornecem suporte mecânico às plantas vasculares. Geralmente ocorrem em feixes, sendo sua maior característica a espessa parede celular secundária, fontes abundantes de material lignocelulósico. A parede celular representa a fração mais expressa da biomassa, a maior fonte de compostos orgânicos da Terra (STICKLEN, 2008).

A parede celular vegetal possui 95% de fibras e esta é constituída por celulose, lignina, hemicelulose, minerais e outros compostos (proteínas, enzimas e compostos fenólicos) (BRETT e WALDRON, 1996). A cana-de-açúcar apresenta 2/3 de sua massa em material lignocelulósico. Este é um recurso energético abundante representando enorme potencial para a produção de etanol lignocelulósico.

Para cada tonelada de cana-de-açúcar colhida, aproximadamente 250 kg de bagaço é produzido, correspondendo a 25% do total de cana moída (SILVA, 2007). No Brasil, o uso do bagaço da cana-de-açúcar incrementa a produção de etanol uma vez que seu conteúdo é composto aproximadamente de: 23 a 50% celulose, 25% pentosanas, 20 a 30% lignina e 2,4% em minerais (PANDEY et al., 2008). O restante pode servir como matéria-prima na produção de etanol por meio da hidrólise ácida e/ou enzimática.

Outro constituinte da fibra é a lignina e altos níveis deste componente dificultam a exploração agro-industrial de várias espécies vegetais, pois dificultam o acesso de enzimas hidrolíticas aos carboidratos fermentáveis, acarretando perdas no processo e aumentando o custo de produção, uma vez que a enzima é consumida no decorrer do processo (CANTARELLA et al., 2004).

Assim, muito esforço visando a obtenção de cana-de-açúcar com reduzidos teores de ligninas ou com melhor qualidade de açúcar têm sido despendidos pelas empresas em programas de melhoramento genético. O advento das técnicas de engenharia genética, incluindo o isolamento e a caracterização de genes, a modificação e a manipulação da expressão destes e a transgênese vegetal vem contribuindo para a obtenção espécies vegetais com reduzidos teores de ligninas (BAUCHER et al., 1998; 2003). Ainda existe a necessidade de adequação dessas tecnologias para a obtenção de plantas de cana-de-açúcar com teores de ligninas mais adequados para a produção de álcool, uma vez que estes efeitos ainda não foram bem caracterizados.

2.4.2.1 Celulose e hemicelulose

São formadas por unidades básicas, chamadas de monossacarídeos (arabinose, ramosa, galactose, glicose, xilose e manose). A biossíntese desses monômeros e a incorporação dos mesmos na parede celular envolvem a atividade de várias enzimas e substratos de nucleotídeos-açúcares, tais como: UDP-glicose, UDP-glucuronato, UDP-galactose, UDP-xilose, e UDP-arabinose (REITER e VANZIN, 2001).

Em relação à celulose, é o polissacarídeo natural mais abundante na terra e principal componente da parede celular (23% - 50% da matéria seca da biomassa lignocelulósica). Sua cadeia é um polímero linear que contém até 15.000 unidades de β -D-glicoses, unidas através de ligações glicosídicas β 1,4, resultando num polímero de alto peso molecular (PÉREZ et al., 2002; ZHANG et al., 2006a). Além destas ligações, são encontradas forças de van der Waal's (ZHANG e LYND, 2004) e pontes de hidrogênio inter e intramoleculares (SHULER e KARGI, 1992). As ligações intermoleculares são responsáveis pela rigidez; e as

intramoleculares pela formação de fibrilas, estruturas altamente ordenadas (regiões cristalinas) que se associam formando as fibras de celulose. As fibrilas apresentam desde regiões com elevado grau de cristalinidade, nas quais as cadeias de glicana estão firmemente ligadas em paralelo, até regiões com menor grau de ordenação, chamadas de regiões amorfas (PITARELO, 2007; ZHAO et al., 2007). Na Figura, encontram-se representadas essas ligações, sendo OH(6)---OH(3'') e OH(3)---OH(5'), ligações intermolecular e intramolecular, respectivamente.

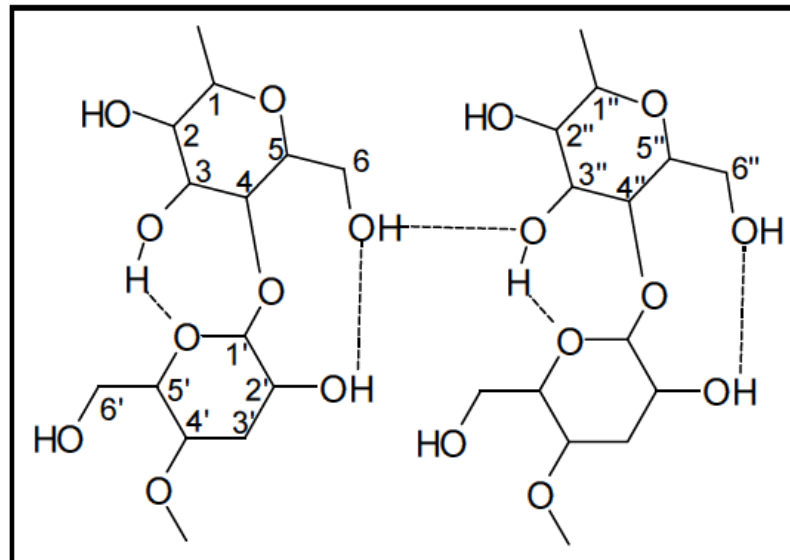


Figura 3: Representação das ligações inter- e intramoleculares nas cadeias de celulose (Fonte: MORGENSTERN e KAMMER, 1996).

Por sua vez, a fração hemicelulósica (15% - 45% do material lignocelulósico seco) consiste em cadeias ramificadas de açúcares, cujas unidades incluem principalmente aldopentoses, como xilose e arabinose, e aldohexoses, como glicose, manose e galactose. Esta macromolécula contém ainda, ácidos hexurônicos, como os ácidos β -D-glucurônico, D-4-O-metilglucurônico e β -D-galacturânico, e deoxiexoses (MARTINS, 2005; KOOTSTRA et al., 2009). O grau de polimerização das hemiceluloses não ultrapassa o valor médio de 200 unidades de anidro açúcar, portanto, bastante inferior ao da celulose (PITARELO, 2007; ANDREAUS et al., 2008).

A cadeia principal de uma hemicelulose (figura 4) pode ser uma só unidade (homopolímero) como a Xilana ou de duas ou mais unidades (heteropolímero), com a glucamanana unidas entre si por ligações de hidrogênio (PASTORE, 2004).

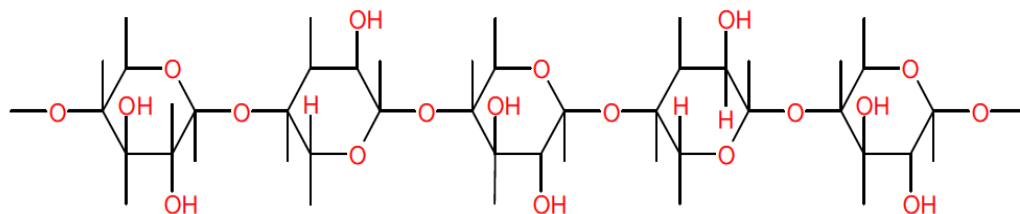


Figura 4: Estrutura molecular parcial da hemicelulose.

Nas monocotiledôneas como as gramíneas, a parede celular é composta principalmente de xilanas (ALBERTS et al., 1997; REID, 2000; VORWERK et al., 2004).

A composição das hemiceluloses pode variar entre espécies e estádios de desenvolvimento. As madeiras em geral possuem de 20% a 30% de hemicelulose na composição geral, enquanto que nas gramíneas esse valor é de 20% a 40% (SJÖSTRÖM, 1992).

2.4.2.2 Lignina

Representa de 20 a 30% da massa total do material lignocelulósico (RABELO, 2007). Sua estrutura apresenta forma tridimensional e é formada por unidades de p-propilfenol, com substituintes metoxila no anel aromático, unidas por ligações do tipo éter e que estabelecem ligações cruzadas entre si. Esta macromolécula é formada pela polimerização de três diferentes monômeros: álcool cumárico, álcool coniferílico e álcool sinapílico (SALIBA et al., 2001; LEMOS, 2006), denominados monolignóis. Pode ser encontrada abundantemente na lamela média assim como na parede secundária das células das plantas (FASANELLA, 2008). A função essencial da lignina é a estruturação das paredes celulares, que confere rigidez e firmeza aos tecidos de sustentação. Em cana-de-açúcar a maior fração está ligada à região periférica do colmo, junto à casca. Outros locais ricos em precursores de lignina (ex: polifenóis) estão principalmente nas regiões meristemáticas. Em outros aspectos, a lignina é um importante metabólito para as funções de defesa de estresses bióticos e abióticos, mas seu papel fundamental fisiológico está associado mais intimamente à estrutura e sustentação do porte ereto em cana-da-açúcar.

2.5 Genética Molecular Aplicada ao Melhoramento da Cana-de-Açúcar

O surgimento da engenharia genética no final da década de 80 mostrou inúmeras opções atraentes para os melhoristas convencionais, que passaram a utilizar técnicas moleculares. Com o desenvolvimento dessas técnicas modernas de análises e manipulação genética de plantas, o melhoramento tradicional da cana-de-açúcar ganhou o suporte da biotecnologia. Isto tem proporcionado o aparecimento de soluções para problemas do melhoramento tradicional que não podem ser resolvidos através de cruzamentos, seja por indisponibilidade dos genes de interesse ou por necessidade de obtenção de novas variedades em curto prazo (SACIOTO et al., 2003).

Muitas são as técnicas genômicas disponíveis, mas os marcadores moleculares são os mais utilizados mostrando ser uma valiosa ferramenta, pois têm grande potencial na melhoria da eficiência dos programas de melhoramento. A incorporação destes na seleção de características econômicas durante os primeiros estágios de melhoramento, assim como, na escolha de melhores parentais em um cruzamento pode reduzir significativamente o tempo de desenvolvimento de novas variedades. Estes objetivos podem ser alcançados com sucesso com a disponibilidade de marcadores polimórficos robustos que co-segregam com características agrícolas economicamente importantes.

Um progresso no entendimento sobre a complexidade genética e genômica da cana-de-açúcar tem sido alcançado com o emprego de marcadores moleculares. As informações coletadas sobre a diversidade envolvendo o germoplasma de *S. officinarum* e *S. spontaneum* em estudos recentes têm demonstrado que a espécie *S. spontaneum* possui os níveis mais altos de diversidade (GLASZMAN et al., 1990; BURNQUIST et al., 1992; SOBRAL et al., 1994; NAIR et al., 1999; PAN et al., 2004), enquanto *S. officinarum* apresenta quantidade considerável de diversidade (JANNOO et al., 1999; SELVI et al., 2003; AITKEN et al., 2006; ALWALA et al., 2006; BROWN et al., 2007). Dentre os marcadores moleculares empregados

para análise da diversidade genética entre cultivares de cana-de-açúcar e dentre estas, os microssatélites baseados em ESTs apresentaram-se como os mais apropriados (UKOSKIT et al., 2012).

Os marcadores podem também ser usados na classificação dos indivíduos em grupos heteróticos (OLIVEIRA et al., 2009), na identificação de cultivares, no controle da progênie e no monitoramento da introgressão de genes de interesse em cana-de-açúcar (D'HONT et al., 1995; HARVEY et al., 1998; CORDEIRO et al., 2000) são usados no entendimento sobre a genômica da cultura da cana através da análise de elementos transponíveis (ROSSI et al., 2001). Além disso, podemos destacar a utilização de marcadores em estudos de mapeamento genético e de QTL's (*Quantitative Trait Loci*) o que tem proporcionado um importante progresso no conhecimento da estrutura genômica e na genética da cana-de-açúcar. Mapas genéticos parciais foram produzidos para *S. spontaneum* (AL-JANABI et al., 1993; DA SILVA et al., 1993; MING et al., 1998; 2002), *S. officinarum* (AL-JANABI et al., 1993; MUDGE et al., 1996; MING et al., 1998, GUIMARÃES et al., 1999) e para cultivares modernos (D'HONT et al., 1994; GRIVET et al., 1996; HOARAU et al., 2001; AITKEN et al., 2005; REFFAY et al., 2005; RABOIN et al., 2006; GARCIA et al., 2006). A integração das informações contidas nesses mapas individuais em um único mapa integrado, é uma grande vantagem para espécies poliplóides, como a cana-de-açúcar, através do uso de diferentes marcadores moleculares (GARCIA et al., 2006; GAZAFFI et al., 2010), pois permite aumentar a saturação do mapa de ligação e estender a caracterização do polimorfismo para todo o genoma (DA SILVA et al., 1993; GRIVET et al., 1996). No entanto, Garcia et al. (2006) e Oliveira et al. (2007) obtiveram pouca cobertura do genoma ao construírem mapas integrados para cana-de-açúcar, a qual também foi recentemente verificada por Pastina (2010) e Margarido (2011). Eventualmente também são utilizados na realização da chamada seleção assistida, apesar de que muito ainda deve ser feito antes que a SAM para características agrônômicas quantitativas possa ser aplicada.

A informação fornecida pelos marcadores moleculares pode realmente ser muito útil para o melhoramento genético da cana-de-açúcar. Seu uso tanto em estudos filogenéticos como também na construção de mapas genéticos tem esclarecido, pelo menos parcialmente, a relação entre espécies de *Saccharum* e a arquitetura genética das cultivares. Com o uso de outras novas ferramentas moleculares, espera-se também que um rápido progresso na pesquisa genética/genômica seja alcançado e que a aplicação das mesmas seja uma prática rotineira em programas de melhoramento de cana (WANG et al., 2010).

2.5.1 O melhoramento assistido por marcadores moleculares na cana-de-açúcar

A seleção assistida por marcadores (SAM) fundamenta-se no conceito de que é possível inferir a presença de um gene a partir de um marcador fortemente ligado a este. Quando o marcador se encontra muito longe da região de interesse, a possibilidade de ambos serem transmitidos aos indivíduos da progênie é reduzida devido aos eventos de recombinação. Sendo assim, a existência de uma forte ligação entre a característica de interesse e o marcador é pré-requisito neste tipo de seleção (KUMAR, 1999).

2.5.2 Marcadores microssatélites

Os microssatélites ou SSRs (*Simple Sequence Repeat*) tornaram-se amplamente empregados nos estudos de marcadores de plantas. São sequências repetidas em tandem que variam de 1 a 6 pares de bases (CAIXETA et al., 2013). O uso dos microssatélites como marcadores moleculares deve-se ao grande polimorfismo das regiões repetitivas resultantes dos eventos mutagênicos (*crossing over* desigual, retrotransposição e deslizamento da DNA polimerase- slippage), aliado ao fato de as sequências de DNA que os flanqueiam normalmente serem conservadas entre indivíduos da mesma espécie. Isso permite o desenho de primers específicos (20 a 30 pb) para as sequências adjacentes ao microssatélite polimórfico, de maneira que, por meio de reação de PCR, seja possível amplificar esse loco. (CAIXETA et al., 2013).

Tais marcadores podem ser classificados de diferentes maneiras, dependendo do seu tamanho, tipo de unidade de repetição e sua localização no genoma. Em relação ao tamanho podem ser denominados como mononucleotídeo, dinucleotídeos, trinucleotídeos, tetranucleotídeos, pentanucleotídeos e hexanucleotídeos. Conforme a composição das sequências repetidas pode ocorrer: (a) repetições perfeitas, quando não apresentam nenhuma interrupção, por exemplo: GTGTGTGTGTGTGT; (b) repetições imperfeitas, quando são interrompidas por bases que não correspondem ao motivo, por exemplo: GTGTGTGTAGTGTGTGT; (c) repetições compostas, quando duas ou mais repetições (classes) de microssatélites estão dispostas de maneira adjacentes, por exemplo: GTGTGTGTGTGTCACACACACACA. E por fim quanto à localização em: nuclear (nuSSRs), cloroplasto (coSSRs) e mitocôndria (mtSSRs) (OLIVEIRA et al., 2006).

Apresentam natureza multialélica e herança codominante devido à capacidade de distinguir entre os homocigotos e heterocigotos para o loco em questão (GRIFFITHS et al., 2002; DECROOCQ et al., 2003; EUJAYL et al., 2004). Essas características somadas à facilidade de detecção pela PCR, alta reprodutibilidade, abundância relativa e cobertura extensiva do genoma (LI et al., 2002) fazem com que esses marcadores apresentem sucesso em diversas espécies, como arroz (GARRIS et al., 2005; THOMSON et al., 2007; JIN et al., 2010), trigo (ZHANG et al., 2006b; GANEVA et al., 2009), cevada (MARCEL et al., 2007), batata (ISPIZÚA et al., 2007; MATHIAS et al., 2007), batata-doce (VEASEY et al., 2008; ARIZIO et al., 2009), amendoim (FREITAS et al., 2007), uva (LAIADI et al., 2009; LEÃO et al., 2009), abacate (BORRONE et al., 2009), estimulando a aplicação desta técnica também para espécies com elevada complexidade genética, como a cana-de-açúcar (CORDEIRO et al., 2000).

2.5.3 O uso dos microssatélites genômicos e funcionais

Marcadores microssatélites derivado de DNA genômico têm sido extensivamente usado ao longo da última década no melhoramento de plantas. Em especial, destaca-se o uso desses marcadores nos trabalhos de mapeamento genético, na identificação de QTLs (*Quantitative Trait loci*), nos estudos de diversidade em bancos de germoplasmas, na seleção assistida por marcadores (SAM) e, recentemente em estudos de seleção genômica ampla (CAIXETA et al., 2013). Baseiam-se no isolamento e sequenciamento de clones contendo possíveis motivos SSRs, seguidos de desenho de *primers* para as regiões flangeadoras dos motivos (ZANE et al., 2002), o que torna esse processo demorado, trabalhoso e de elevado custo. Além disso, a técnica reside na análise de pequena amostragem do genoma por ensaio, mesmo usando o ensaio multiplex. Por se tratar de um marcador loco específico, apenas poucos locos são analisados por experimento (CAIXETA et al., 2013).

A busca na redução do custo e do tempo gasto no desenvolvimento de SSRs genômicos levou ao desenvolvimento de processos de clonagem para criação de bibliotecas enriquecidas com SSRs (EDWARDS et al., 1996), no entanto o desenvolvimento de tais marcadores permaneceu laborioso. Uma alternativa mais simples, rápida e econômica seria a busca de SSRs em sequências expressas depositadas em bancos de dados públicos e privados de DNA. Aliadas às novas técnicas de bioinformática, as milhares de sequências permitiriam que o desenvolvimento de *primers* SSR ocorresse sem a necessidade de todas as etapas iniciais da estratégia tradicional.

Os bancos de dados de sequências expressas (ESTs) permitem o desenvolvimento de marcadores microssatélites pela busca de sequências repetitivas (EST-SSRs) no próprio banco de dados, sendo a análise de ESTs uma estratégia simples para o estudo da porção expressa do genoma. Os ESTs-SSRs permitem a análise da região transcrita, facilitando a discriminação de sequências alvos como locos gênicos ligados a caracteres de interesse agrônomico, especialmente em plantas poliplóides (UKOSKIT et al., 2012). Além disso, como se encontram em regiões transcritas do genoma, os sítios de iniciadores são mais conservados, possibilitando a amplificação heteróloga entre espécies e aumentando seu valor em programas de melhoramento (FRASER et al., 2004).

Atualmente, um grande número de projetos abrangendo várias espécies vegetais contém pelo menos 40 mil bibliotecas de ESTs depositadas no Gen Bank. A cana-de-açúcar gênero *Saccharum* é bem representada, com bibliotecas de ESTs de 24 espécies em 78 projetos. Destes, 55 são projetos para ESTs de cultivares comerciais (*Saccharum hybridum*). Dentre eles, o projeto brasileiro SUCEST (*Brazilian Sugarcane EST Project*), abordou o genoma funcional de *Saccharum hybridum* cultivar SP80- 3280 com 135.543 sequências de ESTs e revelou *in silico* 552 sequências de ESTs-SSRs, potencialmente de aplicação direta nos programas de melhoramento genético. Esforços para a catalogação de sequências expressas (ESTs- *Expressed Sequence Tags*) para a cana-de-açúcar em grande parte foram detectadas por Vettore et al. (2003).

Uma vez que a geração dos EST-SSRs tornou-se um atrativo complemento para as coleções existentes de SSRs, podemos reportar sua ocorrência recentemente para a cana-de-açúcar nos trabalhos de Cordeiro et al. (2001), Pinto et al. (2004; 2006), Oliveira et al. (2007), Maccheroni et al. (2009), Ficklin et al. (2010) e Margarido (2011).

2.6 Marcadores Moleculares ESTs-SSRs para Discriminação do Genótipo Associado ao Fenótipo

Programas de melhoramento em cana-de-açúcar até o momento se basearam quase exclusivamente em métodos convencionais fundamentados nas características fenotípicas. A exigência de uma resposta mais rápida exige a integração dos métodos baseados no genótipo ligado ao fenótipo. Marcadores moleculares são ferramentas estratégicas para tais aplicações, especialmente aqueles ligados aos genes de interesse, a exemplo ESTs-SSRs.

Os ESTs-SSRs podem ser aplicados no mapeamento de ligação baseando-se na associação do genótipo/fenótipo (OLIVEIRA et al., 2007), assim como na detecção das múltiplas interações dos alelos com os fenótipos (FICKLIN et al., 2010). Esses marcadores funcionais EST-SSRs tendem a ser menos polimórficos que os marcadores gerados a partir de sequências genômicas, para arroz (CHO et al., 2000), cana-de-açúcar (CORDEIRO et al., 2001; CORDEIRO et al., 2003; PINTO et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2009), cevada (THIEL et al., 2003). Uma das principais razões é o fato de que locos de microssatélites genômicos

(gSSRs) se encontrarem em regiões não codificantes do genoma, sendo com isso menos influenciados pela seleção natural ou artificial.

Os ESTs-SSRs embora menos eficientes, podem ser amplamente recomendados porque simultaneamente geram informações possíveis de serem aplicadas na Seleção Assistida por Marcadores Moleculares por correlacionar o genótipo associado ao fenótipo. A aplicação dos mesmos nas fases de seleção de genitores pode aumentar a eficiência de obtenção de novos cultivares mais produtivas.

2.6.1 ESTs-SSRs discriminates de genes potenciais controladores da biossíntese de sacarose e ou fibras

De um modo geral, a síntese de açúcares mono e dissacarídeos são competidores, e o pool de substrato disponível é dependente das condições ambientais e dos fatores genéticos que atuam sobre os mesmos. A presença ou número de cópias de genes e seus alelos é fundamental para estabelecer o processo de bioconversão de trioses-P em açúcares não-redutores, disponíveis ou na formação de polímeros complexos e completamente estáveis. Diretamente este processo regula o crescimento vegetativo e a deposição de sacarose em cana-de-açúcar, fatores intimamente ligados com a produtividade final, seja na forma de TSH ou de MS.

Dentre os genes selecionados para este estudo, em primeira ordem optou-se por aqueles com SSRs dentro de sua estrutura e em segundo plano, aqueles ligados à bioconversão de trioses-P até a formação de parede celular e controle do crescimento vegetativo, destacando-se os mesmos a seguir.

A proteína fosfatase (PP2C) está diretamente ligada a defosforilação de proteínas da cascata de sinalização e de uma série de outras vias, especialmente aquelas ligadas à síntese de sacarose e a formação de parede celular. O aumento dos teores de sacarose e outros açúcares no citosol é um bom regulador da atividade desta enzima, que parece responder bem a alteração osmótica provocada pelos teores do açúcar. A relação da sinalização de açúcares em cana-de-açúcar foi explorada no trabalho de Branco (2008); em que se relacionou o perfil de expressão gênica entre mudas de *Saccharum ssp.* e *Arabidopsis*, em resposta à tratamento de glicose e sacarose assim como Lei et al. (2011a; 2011b), encontraram evidências genéticas de que a sacarose é um regulador global das respostas à falta de fosfato em *Arabidopsis*.

Outra proteína importante; as aquaporinas (proteína intrínseca da membrana plasmática- PIP), que são pequenas proteínas integrais de membrana (canais de ânions) e atuam diretamente no transporte ativo e passivo da água. Estão relacionadas a uma série de caracteres agrônômicos importantes porque desempenham funções de regulação e captação de água e pequenos solutos para as células (AROCA et al., 2006; HORIE et al., 2011). Além disso, estão relacionadas com a via secretora, que promove o transporte de partículas a partir do retículo endoplasmático (ER). São abundantes em células meristemáticas e pequenos vacúolos. Por meio da técnica de hibridização *in situ* Chaumont et al. (1998), demonstraram uma alta expressão de genes de aquaporinas em meristemas e zonas de crescimento celular como raízes laterais e primórdios foliares. A alta expressão em meristemas e em células em expansão sugere que as aquaporinas são necessárias para a biogênese dos vacúolos e para suportar o rápido influxo de água nestes durante a expansão celular. Estão potencialmente envolvidas nos processos de crescimento e divisão celular são expressas nas células do primórdio foliar e nas células meristemáticas em divisão (CHAUMONT et al., 1998, HACHEZ et al., 2008). Outros trabalhos sugerem o papel das aquaporinas no controle da expansão celular em plantas, relacionado à expressão de genes para aquaporinas com as zonas

de alongamento, divisão e expansão celular em vários tecidos (CHAUMONT et al., 1998; O'BRIEN et al., 2002; HACHEZ et al., 2006). Papini-Terzi et al. (2009) na identificação de genes responsáveis pela regulação do conteúdo de sacarose em cana-de-açúcar relataram que genes da família das aquaporinas apresentaram expressão inversamente proporcional ao teor de brix (sólidos solúveis totais). Entre as aquaporinas identificadas nesses ensaios, duas foram altamente associadas ao teor de açúcar (PAPINI-TERZI et al., 2007).

Cisteína Proteinase (CysP) são peptidil-hidrolases dependentes de um resíduo de cisteína em seu sítio ativo. As propriedades físico-químicas destas proteinases têm sido amplamente caracterizadas, entretanto suas funções biológicas ainda não foram completamente elucidadas (WATANABE et al., 1991; LINTHORST et al., 1993; CORREA et al., 2001). CysP controla a atividade de proteínas que carregam grupamentos tióis (LEE et al., 2004). Elas estão envolvidas em um grande número de eventos, tais como processamento e degradação protéica, germinação, morte celular programada e processos de senescência. Correa et al. (2001) forneceu informação quanto à classificação e possível função das proteinases de cana-de-açúcar, indicando que estas podem estar relacionadas as vias de síntese de fitohormônios, especialmente giberelinas (LEE et al., 2004). As giberelinas são extremamente ativas na indução do alongamento do caule. Estudos mostram que a aplicação de (GAs) provoca aumento no tamanho da célula e no número de células, indicando que as GA s atuam tanto no alongamento da célula como na divisão celular, o que potencializa um aumento na produtividade de sacarose (BRANDÃO, 2010).

As mananases, a exemplo da (1-4) β -manana endohidrolase (1,4 β MEH) são enzimas que clivam as cadeias de mananas, presentes na fração hemicelulósica da parede celular vegetal. Uma das principais enzimas envolvidas na hidrólise de mananas e glucomanas lineares são as 1,4- β -D-manana manohidrolases (conhecidas como β -mananases, EC 3.2.1.78). As β -mananases são endo-hidrolases, que atacam as ligações glicosídicas internas da cadeia estrutural de mananas gerando β -1,4-manooligossacarídeos de cadeia curta (VAN ZYL et al., 2010). Estas enzimas, potencialmente estão ligadas a elongação da parede celular e crescimento vegetativo. Schröder et al. (2009) caracterizaram o gene da (1-4) β -manana endohidrolase e mostraram que a enzima atua sobre os constituintes de hemiceluloses na parede celular, tornando-as mais espessas, porém mais flexíveis.

A 12-Oxofitodienoato redutase-3 (OPR) é uma enzima que tem sido caracterizada em *Arabidopsis thaliana* pelo envolvimento na via biossintética ácido jasmônico (SCHALLER, 2001). De Rosa Júnior et al. (2005), através da técnica de microarranjos de DNA, estudaram a expressão de 1536 ESTs de cana-de-açúcar em resposta à aplicação de metil-jasmonato (MeJA). Mudanças significativas foram observadas em 26 ESTs, cujas sequências codificam proteínas que atuam na fotossíntese, senescência, síntese protéica e resposta a estresses. Em testes realizados com aplicação exógena de AJ na agricultura obtiveram-se vários resultados positivos, como o aumento do rendimento de culturas de morango, soja e também a cana-de-açúcar; estimulação da formação de tubérculos em inhame e batata (KODA, 1992) e amadurecimento em frutos de tomate e maçã (SEMBDNER e PARTHIER, 1993).

As Protein kinase like (PKL) são receptores transmembrânicos com um domínio de quinase de proteínas, conhecidos como RPKs (Receptor-Like Kinases), têm papel importante na percepção e transdução de sinais (BRAUN e WALKER, 1996). Cinco grupos principais de RLKs foram descritos: RLKs com LRRs, que são característicos de alguns receptores já bem descritos como Clavata 1 (CLV1), receptor de brassinosteróide (BR1) e ERECTA; RLKs do tipo CR4 (CRINKLY4), genes essencialmente ligados com a reprodução, estrutura e crescimento da planta. Os RLKs com domínio-S contêm domínios extracelulares similares ao domínio extracelular similar às glicoproteínas do locus-S (genes ligados à autoincompatibilidade). Outros RLKs com domínio semelhante ao fator de crescimento

epidérmico (EGF-like, de epidermal growth factor-like, também denominado de tipo WAK, wall-associated kinase), são conhecidos por controlar a expansão da parede celular, e possivelmente o crescimento vegetativo.

O citocromo b_5 é uma hemoproteína que se encontra presente numa grande diversidade de organismos, existindo uma elevada homologia na sequência de aminoácidos entre várias espécies animais e vegetais (MULROONEY e WASKELL, 2000). Nas plantas superiores, CB5 tem sido implicado como um doador de eletrons na hidroxilação de ácidos graxos (SMITH et al., 1992; KUMAR et al., 2006), a formação da ligação tripla (NAM et al., 2007), a hidroxilação de base esfingolípido de cadeia longa e desnaturação (NAPIER et al., 2003; NAGANO et al., 2009) e em reações mediadas pelo citocromo P450 (DE VETTEN et al., 1999). Além do papel no metabolismo lipídico, recentemente, tem sido relatado que a interação com os ER-like CB5 aumenta a afinidade entre os transportadores de sacarose e sorbitol na membrana plasmática com os seus substratos, o que é crítico para o ajuste do nível de açúcar nas células (FAN et al., 2009). As proteínas de ligação ao DNA (DBP) participam diretamente na regulação da transcrição de genes específicos em virtude da sua capacidade de ligação a DNA, que também pode estar envolvido na regulação de outros processos que não estão diretamente relacionados com a transcrição de genes, particularmente nas vias de transdução de sinais.

Como existe uma grande variabilidade fenotípica entre genótipos de cana-de-açúcar, especialmente para as características desejadas, maior concentração de sacarose em colmos maduros e melhor qualidade de fibras disponíveis (relação favorável entre fibras e lignina), espera-se que marcadores estreitamente ligados a genes de interesse possam facilitar a identificação precoce de genótipos superiores, encurtando o período de seleção, reduzindo assim o tempo de obtenção de novas cultivares. Os microssatélites funcionais (*ESTs-SSRs*) do presente estudo foram selecionados em razão das possíveis associações das funções dos seus respectivos genes com as prováveis características agronômicas estudadas e mostraram-se amplamente discriminativos de tais fenótipos correlacionados.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AITKEN, K.S.; JACKSON, P.A.; MCINTYRE, C.L. A combination of AFLP and SSR markers provides extensive map coverage and identification of homo(eo)logous linkage groups in a sugarcane cultivar. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 110, p. 789-801, 2005.

AITKEN, K.S.; JACKSON, P.A.; MCINTYRE, C.L. Quantitative trait loci identified for sugar related traits in a sugarcane (*Saccharum* spp.) cultivar x *Saccharum officinarum* population. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 112, n. 7, p. 1306-1317, 2006.

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J.D. **Biologia Molecular da Célula**. Porto Alegre: Artes Médicas, 1997. 1294 p.

AL-JANABI, S.M.; HONEYCUTT, R.J.; MCCLELLAND, M.; SOBRAL, B.W.S. A genetic linkage map of *Saccharum spontaneum* L. 'SES208'. **Genetics**, v. 134, p. 1249-1260, 1993.

AL-JANABI, S.M.; HONEYCUTT, R.J.; SOBRAL, B.W.S. Chromosome assortment in *Saccharum*. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 89, p. 959-963, 1994.

ALEXANDER, A.G. **The energy cane alternative**. Amsterdam: Elsevier, 1985. 509 p.

ALIX, K.; BAURENS, F.C.; PAULET, F.; GLASZMANN, J.C.; D'HONT, A. Isolation and characterisation of a satellite DNA family in *Saccharum* complex. **Genome**, v. 41, n. 6, p. 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**, v. 6, p. 962-968, 1999.

ALMEIDA, L.M. **Seleção de famílias de irmãos-completos de cana-de-açúcar e estimativa da diversidade genética via marcador de DNA (ISSR)**. 2010. 71p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, RJ.

ALWALA, S.; SUMAN, A.; ARRO, J.A.; VEREMIS, J.C.; KIMBENG, C.A. Target region amplification polymorphism (TRAP) for assessing genetic diversity in sugarcane germplasm collections. **Crop Science**, v. 46, n. 1, p. 448-445, 2006.

ANDRADE, A.L.B.; CARDOSO, M.B. **Cultura da cana-de-açúcar**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2004.

ANDREAUS, J.; FILHO, E.X.F.; BON, E.P.S. Biotechnology of holocellulose-degrading enzymes. In: HOU, C.T.; SHAW, J.-F (eds). **Biocatalysis and bioenergy**. New York: John Wiley & Sons, 2008. p. 197-229.

ARENCIBIA, A. Gene transfer in sugarcane. In: HOHN, T.; LEISINGER, K.M. (eds.) **Biotechnology of food crops in developing countries**. New York: Springer-Verlag, 1998, p. 79-104.

ARIZIO, C.M.; HOMPANERA, N.; MANIFESTO, M.M. Genotypic identification and diversity evaluation of a sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam) collection using microsatellites. **Plant Genetic Resources**, v.7, n.2, p.135-138, 2009.

AROCA, R.; FERRANTE, A.; VERNIERI, P.; CHRISPEELS, M.J. Drought, abscisic acid and transpiration rate effects on the regulation of PIP aquaporin gene expression and abundance in *Phaseolus vulgaris* plants. **Annals of Botany**, v. 98, p. 1301–1310, 2006.

AUTOMOTIVE BUSINESS. Brasil importa etanol de milho e exporta o de cana. Importações de álcool dos Estados Unidos bateram recorde em 2011. Disponível em: <<http://www.automotivebusiness.com.br/noticia/12772/brasil-importa-etanol-de-milho-e-exporta-o-de-cana>>. Acesso em: jan. 2013.

AVIGAD, G. Sucrose and other disaccharides. In: LOEWUS, F.A.; TANNER, W. (eds.) **Encyclopedia of plant physiology**. Heidelberg: Springer, p. 217-347,1982.

BARBOSA, M.E.; SILVEIRA, L.C.I. Melhoramento genético e recomendação de cultivares. In: SANTOS, F.; BORÉM, A.; CALDAS, C. (orgs.). **Cana-de-açúcar: bioenergia, açúcar e álcool- tecnologias e perspectivas**. Viçosa, MG: Suprema Gráfica e Editora, v.1, 2010. p. 313-331.

BARBOSA, M.H.P.; RESENDE, M.D.; SILVEIRA, L.C.I.; PETERNELLI, L.A. **Estratégias de melhoramento genético da cana-de-açúcar em universidades**. In: SIMPÓSIO SOBRE SELEÇÃO RECORRENTE, 9., 2005 Lavras. **Anais...**Lavras: UFLA, 2005.

BAUCHER, M.; HALPIN, C.; PETIT-CONIL, M.; BOERJAN, W. Lignin: genetic engineering and impact on pulping. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 38, n. 4, p. 305-350, 2003.

BAUCHER, M.; MONTIES, B.; VAN MONTAGU, M.; BOERJAN, W. Biosynthesis and genetic engineering of lignin. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 17, p. 125-197, 1998.

BESSE, P.; MCINTYRE, C.L.; BERDING, N. Characterization of *Erianthus* sect. *Ripidium* and *Saccharum* germplasm (Andropogoneae x Saccharinae) using RFLP markers. **Euphytica**, v. 93, n. 3, p. 283-292, 1997.

BOARETTO, L.F. **Análise do transcrito e proteoma do colmo de cana-de-açúcar relacionada ao metabolismo de sacarose**. 2012. 165 p. Tese (Doutorado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP.

BORRONE, J.W.; BROWN, J.S.; TONDO, C.L.; MAURO-HERRERA, M.; KUHN, D.N.; VIOLI, H.A.; SAUTTER, R.T.; SCHNELL, R.J. An ESTSSR-based linkage map for *Persea americana* Mill.(avocado). **Tree Genetics & Genomes**, v. 5, n. 4, p. 553-560, 2009.

BOSCOLO, M. Sucroquímica: síntese e potencialidades de aplicações de alguns derivados químicos de sacarose. **Química Nova**, v. 26, n. 6, p. 906-912, 2003.

BOTHA, F.C.; BLACK, K.G. Sucrose phosphate synthase and sucrose synthase activity during maturation of intermodal tissue in sugarcane. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 27, p. 81-85, 2000.

BRANCO, D.S. **Sinalização por carboidratos em cana-de-açúcar e divergência evolutiva**. 2008. 203p. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.

BRANDÃO, A.D. **Efeito da giberelina A₃ e do placobutrazol no metabolismo de carboidratos e expressão gênica em plântulas de cana-de-açúcar**. 2010. 255p. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) - Universidade Estadual de Campinas, SP.

BRAUN, D.M.; WALKER, J.C. Plant transmembrane receptors: new pieces in the signaling puzzle. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 21, n. 2, p. 70-73, 1996.

BRESSIANI, J.A. **Seleção seqüencial em cana-de-açúcar**. 2001. 159 p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP.

BRETT, C. T., WALDRON, K. W.; **Physiology and biochemistry of plant cell walls**. 2. ed.; London: Chapman & Hall, 1996. 255 p. (Topics on Plant Functional Biology: 1).

BROWN, J.S.; SCHENELL, R.J.; POWER, E.J.; DOUGLAS, S.L.; KUHN, D.N. Analysis of clonal germplasm from five *Saccharum* species: *S. barberi*, *S. robustum*, *S. officinarum*, *S. sinense* and *S. spontaneum*. A study of inter- and intra species relationships using microsatellite markers. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 54, n. 3, p. 627-648, 2007.

BRUNINI, O. Ambientes climáticos e exploração agrícola da cana-de-açúcar. In: DINARDO-MIRANDA, L.L.; VASCONCELOS, A.C.M. de.; ANDRADE LANDELL, M.G.DE (eds.). **Cana-de-açúcar**. Campinas: Instituto Agrônômico, p. 205-218, 2008.

BURNQUIST, W.L.; SORRELLS, M.E.; TANKSLEY, S. Characterization of genetic variability in *Saccharum* germplasm by means of restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis. **Proceedings of the International Society of Sugar Cane Technologists**, v. 2, p. 355-365, 1992.

BURNQUIST, W.L. Os arquitetos da nova cana. **Revista Pesquisa Fapesp**, v. 59, p. 3-4, 2000.

BUTTERFIELD, M.K.; D'HONT, A.; BERDIND, N. The sugarcane genome: a synthesis of current understanding, and lessons for breeding and biotechnology. **Proceedings of the South African Sugar Technologist's Association**, p. 75-80, 2001.

BUTTNER, M.; SAUER, N. Monosaccharide transporters in plants: structure function and physiology. **Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes**, v. 1465, p. 263-274, 2000.

CAIXETA, E.T.; FERRÃO, L.F.V.; MACIEL-ZAMBOLIM, E. Marcadores moleculares. In: BORÉM, A.; FRITSCHÉ- NETO, R. (eds.). **Biotechnologia aplicada ao melhoramento de plantas**. 1.ed. Visconde do Rio Branco: Suprema, 2013. p. 31-68.

- CALIJA, V.; HIGGINS, A.J.; JACKSON, P.A. BIELING, L.M.; COOMANS, D. An operations research approach to the problem of the sugarcane selection. **Annals of Operations Research**, v. 108, n. 1-4, p. 123-142, 2001.
- CANTARELLA, M.; CANTARELLA, L.; GALLIFUOCO, A.; SPERA, A.; ALFANI, F. Effect of inhibitors released during steam-explosion treatment of poplar wood on subsequent enzymatic hydrolysis and SSF. **Biotechnology Progress**, v. 20, p. 200- 206, 2004.
- CASAGRANDE, A.A. **Tópicos de morfologia e fisiologia da cana-de-açúcar**. Jaboticabal: FUNEP, 1991. 157 p.
- CASAGRANDE, A.A.; VASCONCELOS, A.C.M. Fisiologia da parte aérea. In: DINARDO-MIRANDA, L.L.; VASCONCELOS, A.C.M.; ANDRADE LANDELL, M.G. **Cana-de-açúcar**. Campinas: Instituto Agronômico, p. 57-78, 2008.
- CASU, R.; MANNERS, J.; BONNETT, G.; JACKSON, P.; MCINTYRE, C.; DUNNE R.; CHAPMAN, S.; ERA, A.; GROF, C. Genomics approaches for the identification of genes determining important traits in sugarcane. **Field Crops Research**, v. 92, p. 137-147, 2005.
- CESNIK, R.; MIOCQUE, J. **Melhoramento da cana-de-açúcar**. Brasília, Embrapa Informação Tecnológica, 2004. 307 p.
- CHAMBRA, A.; JAIN R.; RAI, R.K.; SOLOMON, S. Revisiting the source-sink paradigm in sugarcane. **Current Science**, v. 100, n. 7, p. 115-121, 2011.
- CHAUMONT, F.; BARRIEU, F.; HERMAN, E.M.; CHRISPPEELS, M.J. Characterization of a maize tonoplast aquaporin expressed in zones off cell division and elongation. **Plant Physiology**, v. 117, p. 1143-1152, 1998.
- CHEAVEGATTI-GIANOTTO, A.; ABREU, H.M.C.; ARRUDA, P.; FILHO, J.C.B.; BURNQUIST, W.L.; CRESTE, S.; CIERO, L.; FERRO, J.A.; FIGUEIRA, A.V.O.; FILGUEIRAS, T.S.; GROSSI-DE-SÁ, M.F.; GUZZO, E.C.; HOFFMANN, H.P.; LANDELL, M.G.A.; MACEDO, N.; MATSUOKA, S.; REINACH, F.C.; ROMANO, E.; SILVA, W.J.; FILHO, M.C.S.; ULIAN, E.C. Sugarcane (*Saccharum X officinarum*): a reference study for the regulation of genetically modified cultivars in Brazil. **Tropical Plant Biology**, v. 1, p. 62-89, 2011.
- CHEN, P.H.; PAN, Y.B.; CHEN, R.K.; XU, L.P.; CHEN, Y.Q. SSR marker based analysis of genetic relatedness among sugarcane cultivars (*Saccharum* spp. hybrids) from breeding programs in China and other countries. **Sugar Tech**, v. 11, n. 4, p. 347-354, 2009.
- CHO, Y.G.; ISHIL, T.; TEMNYKH, S.; CHEN, X.; LIPOVICH, L.; MCCOUCH, S.R.; PARK, W.D.; AYRES, N.; CARTINHOOUR, S. Diversity of microsatellites derived from genomic libraries and GenBank sequences in rice (*Oryza sativa* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 100, p. 713-722, 2000.
- CIDADE, D.A.P.; GARCIA, R.O.; DUARTE, A.C.; SACHETTO-MARTINS, G.; MANSUR, E. Morfogênese in vitro de variedades brasileiras de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 3, p. 385-391, 2006.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento de safra brasileira: cana-de-açúcar, terceiro levantamento, dezembro/2011 - Companhia Nacional de Abastecimento**. Brasília: CONAB, 2011. 19 p.

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**, v. 160, n. 6., p. 1115-1123, 2001.

CORDEIRO, G.M.; PAN, Y.B.; HENRY, R.J. Sugarcane microsatellites for the assessment of genetic diversity in sugarcane germplasm. **Plant Science**, v. 165, n. 1, p. 181-189, 2003.

CORDEIRO, G.M.; TAYLOR, G.O.; HENRY, R.J. Characterization of microsatellite markers from sugarcane (*Saccharum* spp.), a highly polyploid species. **Plant Science**, v. 155, n.2, p. 161- 168, 2000.

CORREA, G.C.; PINHEIRO, M.G.; MARGIS, R. Identification, classification and expression pattern analysis of sugarcane cysteine proteinases. **Genetics and Molecular Biology**, v. 24, n. 1-4, p. 275-283, 2001.

CONSECANA. Conselho dos Produtores de Cana, Açúcar e Álcool do Estado de São Paulo. **Manual de instruções**. 2.ed. Piracicaba: CONSECANA, 2000. 92 p.

DA SILVA, J.A.G.; SORRELLS, M.E.; BURNQUIST, W.; TANKSLEY, S.D. RFLP linkage map and genome analysis of *Saccharum spontaneum*. **Genome**, v. 36, p. 782-791, 1993.

DECROOCQ, V.; FAVÉM, HAGEN, L.; BORDENHAVE, L.; DECROOCQ, S. Development and transferability of apricot and grape EST microsatellite markers across taxa. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 106, p. 912-922, 2003.

DE ROSA JÚNIOR, V.E.; NOGUEIRA, F.T.S.; MENOSSI, M.; ULIAM, E.C.; ARRUDA, P. Identification of methyl jasmonate responsive genes in sugarcane using cDNA arrays. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.17, n. 1., p. 173-180, 2005.

DE VETTEN, N; TER HORST, J.; VAN SCHAİK, H.P.; DE BOER, A.; MOL., J.; KOES, R. A cytochrome b5 is required for full activity of flavonoid 3', 5'-hydroxylase, a cytochrome P450 involved in the formation of blue flower colors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United State of America**, v. 96, p. 778-783, 1999.

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

D'HONT, A.; GLASZMANN, J.C. Sugarcane genome analysis with molecular markers, a first decade of research. **Proceedings of the International Society of Sugarcane Technologist**, v. 24, p. 556-559, 2001.

D'HONT, A.; GRIVET, L.; FELDMANN, P.; RAO, S.; BERDING, N.; GLASZMANN, J.C. Characterization of the double-genome structure of modern sugarcane cultivars (*Saccharum* spp.) by molecular cytogenetics. **Molecular and General Genetics**, v. 250, n. 4, p. 405-413, 1996.

D'HONT, A.; ISON, D.; ALIX, K.; ROUX, C.; GLASZMANN, J.C. Determination of basic chromosome numbers in the genus *Saccharum* by physical mapping of ribosomal RNA genes. **Genome**, v. 41, p. 221-225, 1998.

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

D'HONT, A.; LU, Y.H.; GONZALEZ DE LEON, D.; GRIVET, L.; FELDMANN, P.; LANAUD, C.; GLASZMANN, J.C. A molecular approach to unraveling the genetics of sugarcane, a complex polyploid of the Andropogoneae tribe. **Genome**, v. 37, p. 222-2230, 1994.

D'HONT, A.; PAULET, F.; GLASZMANN, J.C. Oligoclonal interspecific origin of 'North Indian' and 'Chinese' sugarcanes. **Chromosome Research**, v. 10, n. 3, p. 253-262, 2002.

D'HONT, A.; RAO, S.; FELDMAN, P., GRIVET, P.; ISLAM-FARIDI L.; BERDING, N.; GLASZMANN, J.C. Identification and characterization of intergeneric hybrids, *Saccharum officinarum* x *Erianthus arundinaceus*, with molecular markers and in situ hybridization. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 91, p. 320-326, 1995.

D'HONT, A.; SOUZA, G.M.; MENOSSE, M.; VINCENTZ, M.; VAN-SLUYS, M.A.; GLASZMANN, J.C.; ULIAN, E. C. Sugarcane: a major source of sweetness, alcohol, and bio-energy. In: MOORE, P.; MING, R. (eds.). **Genomics of tropical crop plants**. New York: Springer, 2008. Cap.21, p. 483-513. (Plant Genetic/Genomics, v.1).

DIOLA, V.; BORÉM, A.; SANGLARD, N.A. Ferramentas para o melhorista no futuro. In: BORÉM, A.; FRITSCHÉ- NETO, R. (eds.). **Biotechnologia aplicada ao melhoramento de plantas**. 1.ed. Visconde do Rio Branco: Suprema, 2013. Cap. 9., p.303-336.

DIOLA, V.; FERNANDES, E.C.; BARBOSA, M.H.P.; BRITO, G.G.; SANGLARD, N.A.; VEIGA, C.F.M. Detection of multiple alleles and genotyping-phenotype associated in sugarcane using ESTs-SSR. *No prelo* (Submetido para publicação Plant Breeding).

DIOLA, V.; SANTOS, F. Fisiologia. In: SANTOS, F.; BORÉM, A.; CALDAS, C. **Cana-de-açúcar: bioenergia, açúcar e álcool: tecnologias e perspectivas**. Viçosa: Editora UFV, 2012. p. 25-49.

EDWARDS, K.J.; BARKER, J.H.; DALY, A.; JONES, C.; KARP, A. Microsatellite libraries enriched for several microsatellite sequences in plants. **Biotechniques**, v. 20, p. 758-760, 1996.

ESCHRICH, W. Free space invertase, its possible role in phloem unloading. **Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft**, n. 93, p. 363-378, 1980.

ETHIRAJAN, A.S. Sugarcane hybridization techniques. In: COPERSUCAR INTERNATIONAL SUGARCANE BREEDING WORKSHOP, 1., 1987, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: Centro de Tecnologia Copersucar, 1987. p. 129-147.

EUJAYL, I.; SLEDGE, M.K.; WANG, L.; MAY, G.D.; CHEKOVSKIY, K.; ZWONITZER, J.C. Mian MAR *Medicago truncata* EST-SSRs reveal cross-species genetic markers for *Medicago* spp. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 108, p. 414-422, 2004.

FAN, R.C.; PENG, C.C.; XU, Y.H.; WANG, X.F.; LI, Y. Apple sucrose transporter SUT1 and sorbitol transporter SOT6 interact with cytochrome *b5* to regulate their affinity for substrate sugars. **Plant Physiology**, v. 150, n. 4, p. 1880-1901, 2009.

FASANELLA, C. C. **Ação das enzimas ligninolíticas produzidas por *Aspergillus niger* e *Penicillium* sp. em bagaço de cana-de-açúcar tratado quimicamente.** 2008. 80 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ), Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP.

FERNANDES, A.C. Refratômetro de campo. **Boletim Técnico Copersucar**, v. 19, p. 5-12, 1982.

FICKLIN, S. P.; LUO, F.; FELTUS, F.A. The association of multiple interacting genes with specific phenotypes in rice (*Oryza sativa*) using gene co-expression networks. **Plant Physiology**, v. 154, n. 1, p. 13-24, 2010.

FRANÇA, B.H. C.; JASINSKI, M. **Cultivo de cana-de-açúcar.** Dossiê Técnico, Rio de Janeiro. 19 p. Novembro, 2007. Disponível em: <<http://sbprt.ibict.br/dossietecnico/downloadsDT/Mjgw>> Acesso em novembro de 2012.

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

FREITAS, F.O.; MORETZSOHN, M.C.; VALLS, J.F.M. Genetic variability of Brazilian indian landraces of *Arachis hypogaea* L. **Genetics and Molecular Research**, v.6 , n. 3 p. 675-684, 2007.

GANEVA, G.; KORZUN, V.; LANDIEVA, S.; POPOVA, Z.; CHRISTOV, N. Genetic diversity assessment of Bulgarian durum wheat (*Triticum durum* Desf.) landraces and modern cultivars using microsatellite markers. **Genetics Resources and Crop Evolution**, v. 57, n. 2, p. 273-285, 2009.

GARCIA, A.A.F.; KIDO, E.A.; MEZA, A.N.; SOUZA, H.M.B.; PINTO, L.R.; PASTINA, M.M.; LEITE, C.S.; DA SILVA, J.A.G.; ULIAN, E.C.; FIGUEIRA, A.; SOUZA, A.P. Development of an integrated genetic map of a sugarcane (*Saccharum* spp.) commercial cross, based on a maximum-likelihood approach for estimation of linkage and linkage phases. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 112, p. 298-314, 2006.

GARRIS, A.J.; TAI, T.H.; COBURN, J.; KRESOVICH, S.; MCCOUCH, S. Genetic structure and diversity in *Oryza sativa* L. **Genetics**, v. 169, n. 3, p. 1631-1638, 2005.

GARSMEUR, O.; CHARRON, C.; BOCS, S.; JOUFFE, V.; SAMAIN, S.; COULOUX, A.; DROC, G.; ZINI, C.; GLASZMANN, J.C.; VAN SLUYS, M.A. High homologous gene conservation despite extreme autopolyploid redundancy in sugarcane. **The New Phytologist**, v. 189, n. 2, p. 629-642, 2011.

GAZAFFI, R.; OLIVEIRA, K.M.; SOUZA, A.P.; GARCIA, A.A.F. Sugarcane: breeding and genetic mapping. In: CORTEZ, L.A.B. (ed.). **Sugarcane bioethanol: R&D for productivity and sustainability**. São Paulo: Blucher, 2010. p. 333-344.

GIAMALVA, M.J.; CLARKE, S.J.; STEIN, J.M. Sugarcane hybrids of biomass. **Biomass**, v. 6, n. 1-2, p. 61-68, 1984.

GLASZMANN, J.C.; LU, Y.H.; LANAUD, C. Variation of nuclear ribosomal DNA insugarcane. **Journal of Genetics and Breeding**, v. 44, n. 3, p. 191-198, 1990.

GLASZMANN, J.C.; NOYER, J.L.; FAUTRET, A.; FELDMANN, P.; LANAUD, C. Biochemical genetic markers in sugarcane. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 78, n.4, p. 537-543, 1989.

GOMES, F.P; LIMA, U.A. A cana-de-açúcar no mundo. In: MALAVOLTA, E. (coord.). **Cultura e adubação da cana-de-açúcar**. São Paulo: Instituto Brasileiro de Potassa, 1964. 368 p.

GOVINDJEE, E.; GOVINDJEE, R. Whats is photosynthesis. Disponível em <<http://www.life.illinois.edugovindjeewhatisit.htm>>. Acesso em: 22 de dezembro de 2012.

GRAVOIS, K.A.; MILLIGAN, S.B. Genetic relationship between fiberand sugarcane yield components. **Crop Science**, v. 32, p. 62-67, 1992.

GRIFFITHS, A.G.; BARRETT BA, ELLISON, N.; SAWBRIDGE, T.; SPANGENBERG, G.; BRYAN, G.J, SCHREIBER, M. Getting out there: transportability of white clover EST and genomic DNA-derived microsatellites. AUSTRALASIAN PLANT BREEDING CONFERENCE, 12., Perth, 2002, **Proceedings...** Perth: Dept. of Agriculture; Austrlasian Plant Breeding Association. p. 69-72.

GRIFFITHS, A.J.F.; GELBART.W.M.; LEWONTIN, R.C.; WESSLER, S.R.; SUZUKI, D.T.; MILLER, J.H. **An introduction to genetic analysis**. 8.ed. New York: W.H. Freeman & Company, 2004. 800 p.

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

GRIVET, L.; D'HONT, A.; ROQUES, D.; FELDMANN, P.; LANAUD, C.; GLASZMANN, J.C. RFLP mapping in cultivated sugarcane (*Saccharum* spp): genome organization in a highly polyploid and aneuploid interspecific hybrid. **Genetics**, v. 142, p. 987-1000, 1996.

GROF, C.P.L.; CAMPBELL, J.A. Sugarcane sucrose metabolism: scope for molecular manipulation. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 28, p. 1-12, 2001.

GROF, C.P.L.; ALBERTSON, P.L.; BURSLE, J.; PERROUX, J.M.; BONNETT, G.D.; MANNERS, J.M. Sucrose 5 phosphate synthase, a biochemical marker of high sucrose accumulation in sugarcane. **Crop Science**, v. 47, p. 15305-1539, 2007.

GUIMARÃES, C.T.; HONEYCUTT, R.J.; SILLS, G.R.; SOBRAL, B.W.S. Genetic maps of *S. officinarum* L. and *S. robustum* Brandes & Jew. ex grassl. **Genetics and Molecular Biology**, v. 22, n. 1, p. 125-132, 1999.

HA, S.; MOORE, P.; HEINZ, D.; KATO, S.; OHMIDO, N.; FUKUI, K. Quantitative chromosome map of the polyploid *Saccharum spontaneum* by multicolor fluorescent *in situ* hybridisation and imaging methods. **Plant Molecular Biology**, v. 39, n. 6, p. 1165-1173, 1999.

HACHEZ, C.; HEINEN, R.B.; DRAYE, X.; CHAUMONT, F. The expression pattern of plasma membrane aquaporins in maize leaf highlights their role in hydraulic regulation. **Plant Molecular Biology**, v. 68, n. 4-5, p. 337-353, 2008.

HACHEZ, C.; MOSHELION, M.; ZELAZNY, E.; CAVEZ, D.; CHAUMONT, F. Localization and quantification of plasma membrane aquaporin expression in maize primary root: a clue to understanding their role as cellular plumbers. **Plant Molecular Biology**, v. 62, p. 305-323, 2006.

HARVEY, M.; D'HONT, A.; ALIX, K.; HUCKETT, B. Use PCR-based markers for identification of *Erianthus* genetic material in putative intergeneric hybrids (*Saccharum x Erianthus*). **Proceedings of the South African Sugar Technologist's Association**, v. 72, p. 218-320, 1998.

HIETER, P.; GRIFFITHS, T. Polyploidy - more is more or less. **Science**, v. 285, p. 210-211, 1999.

HILL, J.; NELSON, E.; TIMAN, D.; POLASKY, S.; TIFFANY, D. Environmental, economic, and energetic costs and benefits of biodiesel and ethanol biofuels. **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 103, n. 43, p. 11210, 2006.

HOARAU, J-Y.; OFFMANN, B.; D'HONT, A.; RISTERUCCI, A-M.; ROQUES, D.; GLASZMANN, J.C.; GRIVET, L. Genetic dissection of a modern sugarcane cultivar (*Saccharum* spp.). I. Genome mapping with AFLP markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 103, p. 84-97, 2001.

HORIE, T.; KANEKO, T.; SUGIMOTO, G.; SASANO, S.; PANDA, S. K.; SHIBASAKA, M.; KATSUHARA, M. Mechanisms of water transport mediated by PIP aquaporins and their regulation via phosphorylation events under salinity stress in barley roots. **Plant Cell Physiology**, v. 52, n. 4, p. 663-675, 2011.

HUBER, S.C.; HUBER, J.L. Role and regulation of sucrose phosphate in higher plants. **Annual Review of Plant Physiology of Plant Molecular Biology**, v. 47, p. 431-444, 1996.

ISPIZÚA, N.V. Genetic diversity of potato landraces from northwestern Argentina assessed with simple sequence repeats (SSRs). **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 54, p. 1833-1848, 2007.

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

JACKSON, R.C. Polyploidy and diploidy: new perspectives in chromosome pairing and its evolutionary implications. **American Journal of Botany**, v. 69, p. 1512-1523, 1982.

JANNOO, N. **Structure et dynamique du genome des cultivars modernes de canne a sucre (*Saccharum spp.*): apports du marquage moleculaire (RFLP)**. 1998. Ph.D. Thesi - Institut National Agronomique Paris-Grignon, Paris.

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**, v. 99, n. 1-2, p. 171-184, 1999.

JIN, L.; LU, Y.; XIAO, P.; BAO, J. Genetic diversity and population structure of a diverse set of rice germplasm for association mapping. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 121, p. 475-487, 2010.

JOHNSON, J.M-F.; COLEMAN, M.D.; GESH, R. JARADAT, A.; MITCHELL, R.; REICOSKY, D.; WILHELM, W.W. Biomass-bionergy crops in the United States: a changing paradigm. **The Americas Journal of Plant Science and Biotechnology**, v. 1, n. 1, p. 1-28, 2007.

KOCH, K. Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development. **Current Opinon in Plant Biology**, v. 7, p. 235-246, 2004.

KODA, Y. The role of jasmonic acid and related compounds in the regulation of plant development. **International Review of Cytology**, v. 135, p. 155-159, 1992.

KOEHLER, S.M.; HO, T.H.D. Hormonal regulation, processing, and secretion of cysteine proteinases in barley aleurone layers. **Plant Cell**, v. 2, p. 769-783, 1990.

KOMOR, E. The physiology of sucrose storage in sugarcane. In: GUPTA, A.K.; KAUR, N. (eds.). **Carbohidrate reserves in plants: shyntesis and regutation**. Amsterdam: Elsevier Science, 2000. p. 35-53.

KOOTSTRA, A.M.J.; BEEFTINK, H.H.; SCOTT. E.L.; SANDERS, J.P.M. Optimization of the dilute maleic acid pretreatment of wheat straw. **Biotechnology for Biofuels**, v. 2, n. 31, p. 1-14, 2009. Disponível em: <<http://www.biotechnologyforbiofuels.com/content/pdf/1754-6834-2-31.pdf>> Acesso em dez de 2012.

KUMAR, LS. DNA markers in plant improvement: an overview. **Biotechnology Advances**, v. 17, n. 2-3, p. 143-182, 1999.

KUMAR, R.; WALLIS, J.G.; SKIDMORE, C.; BROWSE, J. A mutation in Arabidopsis cytochrome *b5* reductase identified by high-throughput screening differentially affects hydroxylation and desaturation. **The Plant Journal**, v. 48, n. 6, p. 920-932, 2006.

LAIADI, Z.; BENTCHIKOU, M. M.; BRAVO, G.; CABELLO, F.; MARÍNEZ-ZAPATER. Molecular identification and genetic relationships of Algerian grapevine cultivars maintained at the germoplasm collection of Skikda (Algeria). **Vitis**, v. 48, p. 25-32, 2009.

LAM, E.; SHINE, JR, J.; DA SILVA, J.; LAWTON, M.; BONOS, S.; CALVINO, M.; CARRER, H.; SILVA-FILHO, M.C.; GLYNN, N.; HELSEL, Z.; MA, J.; RICHARD JR, E.; SOUZA, G.M., MING, R. Improving sugarcane for biofuel: engineering for an even better feedstock. **Global Change Newsletter**, v. 1, p. 251-255, 2009.

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

LEÃO, P. C. S.; RIAZ, S.; GRAZIANI, R.; DANGL, G. S.; MOTOIKE, S. Y.; WALKER, M. Characterization of a Brazilian grape germplasm collection using microsatellite markers. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 60, p. 517-524, 2009.

LEE, S.; JUNG, K.; AN, G.; CHUNG, Y. Isolation and characterization of a rice cysteine protease gene, *OsCPI*, using T-DNA gene-trap system. **Plant Molecular Biology**, v. 54, n. 5, p. 755-765, 2004.

LEI, M.; LIU, D. Sucrose regulates plant responses to deficiencies in multiple nutrients. **Plant Signaling & Behavior**, v. 6, n. 8, p. 1247-1249, 2011a.

LEI, M.; LIU, Y.; ZHANG, B.; ZHAO, Y.; WANG, X.; ZHOU, Y.; RAGHOTHAMA, K. G.; LIU, D. Genetic and genomic evidence that sucrose is a global regulator of plant responses to phosphate starvation in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v. 156, n. 3, p. 1116-1130, 2011b.

LEITCH, I.J.; BENNET, M.D. Polyploidy in angiosperms. **Trends in Plant Science**, v. 2, p. 470-476, 1997.

LEITE, G. H. P. **Maturação induzida, alterações fisiológicas, produtividade e qualidade tecnológica da cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.)**. 2005. 156 f. Dissertação (Mestrado em Agricultura) – FCA/ UNESP, Botucatu, SP.

LEMONS, J.L.S. **Seleção de microrganismo para produção de xilanases em bagaço de cana-de-açúcar**. In: Série Tecnologia Ambiental - CETEM/MCT. Rio de Janeiro, 2006. Disponível em: <http://www.cetem.gov.br/publicacao/cetem_sta_35.pdf>. Acesso em 10 jan. 2013.

LEWIS, W.H. **Polyploidy: biological relevance**. New York: Plenum, 1980, 583 p.

LICHTENTHALER, F.W.; PETERS, S.C.R. *Chimie*, v. 7, n. 2, p. 65-90, 2004.

LINGLE, S.E. Effect of transient temperature change on sucrose metabolism in sugarcane internodes. **Journal of the American Society of Sugar Cane Technologists**, v. 24, p. 132-141, 2004.

LINTHORST, H.J.M.; VAN DER DOES, C.; VAN KAN, J.A.L.; BOL, J.F. Nucleotide sequence of a cDNA clone encoding tomato (*Lycopersicon esculentum*) cysteine proteinase. **Plant Physiology**, v. 101, p. 705-706, 1993.

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**, v. 78: p. 217-226, 1994.

LUCCHESI, A.A. Cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.). In: CASTRO, P.R.C.; KLUGE, R.A. (eds.). **Ecofisiologia de culturas extrativas: cana-de-açúcar; seringueira; coqueiro; dendezeiro e oliveira**. Cosmópolis: Stoller do Brasil, 2001. p. 13-45.

MACCHERONI, W.; JORDÃO, H.; DE GASPARI, R.; MOURA, G. L.; MATSUOKA, S. Development of a dependable microsatellite-based. **Sugar Cane International**, v. 27, n. 2, p. 8-13, 2009.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Cana-de-açúcar. Disponível em <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/cana-de-acucar>>. Acesso em: junho 2012.

MARCEL, T.C.; VARSHNEY, R.K.; BARBIERI, M.; JAFARY, H.; DE KOCK, M.J.; GRANER, A.; NIKS RE. A high-density consensus map of barley to compare the distribution of QTLs for partial resistance to *Puccinia hordei* and of defence gene homologues. **Theoretical and Applied Genetic**, v. 114, n. 3, p. 487-500, 2007.

MARGARIDO, G.R.A. **Mapeamento de QTL's em múltiplos caracteres e ambientes em um cruzamento comercial de cana-de-açúcar usando modelos mistos**. 2011. 107 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

MARQUES, M.O.; MARQUES, T.A.; TASSO JÚNIOR, L.C. **Tecnologia do açúcar. Produção e industrialização da cana-de-açúcar**. Jaboticabal-SP: Funep, 2001. 166 p.

MARTINS, L. F. **Caracterização do complexo celulásico de *Penicillium echinulatum***. 2005. 138 p. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, RJ. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/1884/8807>>. Acesso em 15 dez. 2012.

MATHIAS, M.; SAGREDO, B.; KALAZICH, J. Uso de marcadores SSR para identificación de germoplasma de papa en el programa de mejoramiento de inia de Chile. **Agricultura Técnica**, v. 67, n. 1, p. 3-15, 2007.

MATSUOKA, S.; FERRO, J.; ARRUDA, P. The Brazilian experience of sugarcane ethanol industry. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 5, p. 372-281, 2009.

MATSUOKA, S.; GARCIA, A.A.F.; ARIZONO, H. Melhoramento da cana-de-açúcar. In: BORÉM, A. (ed.). **Melhoramento de espécies cultivadas**. 2.ed. Viçosa: Editora UFV, 2005. p. 205-251.

MCINTYRE, C.L.; JACKSON, M.; CORDEIRO, G.M.; AMOUYAL, O.; HERMANN, S.; AITKEN, K.S.; ELIOTT, F.; HENRY, R.J.; CASU, R.E.; BONNETT, G.D. The identification and characterisation of alleles of sucrose phosphate synthase gene family III in sugarcane. **Molecular Breeding**, v. 18, n. 1. p. 39-50, 2006.

MING, R.; LIU, S.C.; BOWERS, J.E.; MOORE, P.H.; IRVINE, J.E.; PATERSON, A.H. Construction of a *Saccharum* consensus genetic map from two interspecific crosses. **Crop Science**, v. 42, p. 570-583, 2002.

MING, R.; LIU, S.C.; DA SILVA, J.; WILSON, W.; BRAGA, D.; VAN DEYNZE, A.; WENSLAFF, T.F.; WU, K.K.; MOORE, P.; BURNQUIST, W.; SORRELLS, M.E.; IRVINE,

J.; PATERSON, A.H. Detailed alignment of *Saccharum* and *Sorghum* chromosomes: comparative organization of closely related diploid and polyploid genomes. **Genetics**, v. 150, n.4, p. 1663-1682, 1998.

MING, R.; MOORE, P.; WU, K-K.; D'HONT, A.; GKASZMANN, J.C.; TEW, T.L.; MIRKOV, T.E.; SILVA, J.DA; JIFON, J.; RAI, M.; SCHNELL, R.J.; BRUMBLEY, S.M.; LAKSHMANAN, P.; COMSTOCK, J.; PATERSON, A.H. Sugarcane improvement through breeding and biotechnology. In: JANICK, J. (ed.). **Plant Breeding Reviews**. New York: John Wiley e Sons, v. 27, 2006. p. 15-118.

MONTE, A. J.; **Produtor de cana-de-açúcar**. 2.ed. Fortaleza: Instituto Centro de Ensino Tecnológico, Edições Demócrito Rocha; Brasília: Ministério da Ciência e Tecnologia, 2004. 64 p. (Caderno Tecnológico).

MOORE, P.H. Integration of sucrose accumulation processes across hierarchical scales: toward developing and understanding of the gene-to-crop continuum. **Field Crops Research**, v. 92, n. 2-3, p. 119-135, 2005.

MOORE, P. H. Temporal and spatial regulation of sucrose accumulation in the sugarcane stem. **Australian Journal Plant Physiology**, v. 22, n.4, p. 661- 679, 1995.

MORGENSTERN, B.; KAMMER, H-K. Solvation in cellulose-LiCl-DMAc solutions. **Trends in Polymer Science**, v. 4, p. 87-92, 1996.

MUDGE, J., ANDERSEN, W.R.; KEHRER, R.L.; FAIRBANKS, D.J. A RAPD genetic map of *Saccharum officinarum*. **Crop Science**, v. 36, p. 1362-1366, 1996.

MULROONEY, S. B.; WASKELL, L. High-level expression in *Escherichia coli* and purification of the membrane-bound form of cytochrome b₅. **Protein Expression and Purification**, v. 19, n. 1, p. 173-178, 2000.

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

NAGANO, M.; IHARA-OHORI, Y.; IMAI, H.; INADA, N. FUJIMOTO, M. Functional association of cell death suppressor, Arabidopsis Bax inhibitor-1, with fatty acid 2-hydroxylation through cytochrome b. **The Plant Journal**, v. 58, n. 1, p. 122-134, 2009.

NAIDU, K.M.; SREENIVASAN, T.V. Conservation of sugarcane germplasm. In: COPERSUCAR INTERNATIONAL SUGARCANE BREEDING WORKSHOP, 1., 1987, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: Centro de Tecnologia Copersucar, 1987. p. 33-53.

NAIR, N.V.; SREENIVASAN, T.V.; MOHAN, M. Analysis of genetic diversity and phylogeny in *Saccharum* and related genera using RAPD markers. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 46, n. 1, p. 73-79, 1999.

NAM, J.W.; KAPPOCK, T.J. Cloning and transcriptional analysis of *Crepis alpina* fatty acid desaturases affecting the biosynthesis of crepenynic acid. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, n. 6, p. 1421-1432, 2007.

NAPIER, J.A, MICHAELSON, L.V.; SAYANOVA, O. The role of cytochrome b₅ fusion desaturases in the synthesis of polyunsaturated fatty acids. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v. 68, n.2, p. 135–143, 2003.

O'BRIEN, M.; BERTRAND, C.; MATTON, D.P. Characterization of a fertilization-induced and developmentally regulated plasma-membrane aquaporin expressed in reproductive tissues, in the wild potato *Solanum chacoense* Bitt. **Planta**, v. 215, n.3, p. 485-493, 2002.

OLIVEIRA, E.J. PÁDUA, J.G.; ZUCCHI, M.I.; VENCovsky, R.; VIEIRA, M.L.C. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29 n. 2, p. 294-307, 2006.

OLIVEIRA, K.M. **Desenvolvimento de marcadores moleculares EST-SSRs e mapeamento funcional em cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*)** 2006. 186 p. Tese (Doutorado em Genética Vegetal e Melhoramento)- UNICAMP, Campinas, SP.

OLIVEIRA, K.M.; PINTO, L.R.; MARCONI, T.G.; MARGARIDO, G.R.A.; PASTINA, M.M.; TEIXEIRA, L.H.M.; FIGUEIRA, A.M.; ULIAN, E.C.; GARCIA, A.A.F.; SOUZA, A.P. Functional genetic linkage map on EST-markers for a sugarcane (*Saccharum spp.*) commercial cross. **Molecular Breeding**, v. 20, n.3, p. 189-208, 2007.

OLIVEIRA, K.M.; PINTO, L.R.; MARCONI, T.G.; MOLLINARI, M; ULIAN, E.C.; CHABREGAS, S.M.; FALCO, M.C.; BURNQUIST, W.; GARCIA, A.A.; SOUZA, A.P. Characterization of new polymorphic functional markers for sugarcane. **Genome**, v. 52, n. 2, p. 191-209, 2009.

OTTO, S.P.; WHITTON, J. Polyploid incidence and evolution. **Annual Review of Genetics**, v. 34, p. 401-437, 2000.

PALHARES, A.C. **Mapeamento genético de marcadores AFLP e de retrotransposons em cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*)**. 2010. 97 p. Dissertação (Mestrado Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP.

PAN, Y.B.; BURNER, D.M.; LEGENDRE, B.L.; GRISHAM, M.P.; WHITE, W.H. An Assessment of the genetic diversity within a collection of *Saccharum spontaneum* L. with RAPD-PCR. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 51, n. 8, p. 895-903, 2004.

PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V.T. Biotechnological potential of agro-industrial residues: sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 74, p. 69-80, 2008.

PAPINI-TERZI, F.S.; FELIX J.M.; ROCHA, F.R.; WACLAWOVSKY, A.J.; ULIAN, E.C.; CHABREGAS, S.M.; FALCO, M.C.; NIHIYAMA JR., M.Y.; VÊNcio, R.Z.N.; VICENTINI, R.; MENOSSI, M.; SOUZA, G.M. The SUCEST-FUN Project: Identifying genes that regulate sucrose content in sugarcane plants. **Proceedings of International Society of Sugarcane Technologists**, v. 26, p. 123-134, 2007.

PAPINI-TERZI, F.S.; ROCHA F.R.; VÊNcio R.Z.N.; FELIX, J.M.; BRANCO, D.S.; WACLAWOVSKY, A.J.; LEMBKE, C.G.; COSTA, M.D.L.; NISHYAMAM, M.Y.JR.;

VIVENTINI, R.; VIVENTZ, M.G.A.; ULIAN E.C.; MENOSSI, M.; SOUZA, G.M. Sugarcane genes with sucrose content. **BioMed Central Genomics**, v. 10, p. 1-21, 2009.

PARANHOS, S.B. **Cana-de-açúcar: cultivo e utilização**. Campinas: Fundação Cargill, 1987, v.1. 431 p.

PASTINA, M.M. **Mapeamento de QTL's e estudo da interação entre QTL's, ambientes e cortes em cana-de-açúcar, usando a abordagem de modelos mistos**. 2010. 89 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP.

PASTORE, T.C.M. **Estudos do efeito da radiação ultravioleta em madeiras por espectroscopias Raman (FT-Raman), de reflectância difusa no infravermelho (DRIFT) e no visível (CIE-L*a*b)**. 2004. 117p. Tese (Doutorado em Química) - Universidade de Brasília, Brasília, DF.

PÉREZ, J. ; MUNÕS-DORADO, J. ; DE LA RUBIA, T.; MARTÍNEZ, J. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. **International Microbiology**, v. 5, n. 2, p. 53-63, 2002.

PINTO, L.R.; OLIVEIRA, K.M.; MARCONI, T.; GARCIA, A.A.F.; ULIAN, E.C.; SOUZA, A.P. Characterization of novel sugarcane expressed sequence tag microsatellites and their comparison with genomic SSRs. **Plant Breeding**, v. 125, n. 4, p. 378-384, 2006.

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

PIPERIDIS, G.; D'HONT, A. Chromosome composition analysis of various *Saccharum* interspecific hybrids by genomic in situ hybridization (GISH). In: CONGRESS OF THE INTERNATIONAL SOCIETY OF SUGAR CANE TECHNOLOGISTS, 24., Brisbane, Australia, 2001. **Proceedings...** Brisbane: International Society of Sugar Cane Technologists, v. 2, 2001. p. 565-566.

PITARELO, A.P. **Avaliação da susceptibilidade do bagaço e da palha de cana-de-açúcar à bioconversão via pré-tratamento a vapor e hidrólise enzimática**. 2007. 141 p. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR.

PROCANA. Números do setor sucroenergético. Procana Brasil, publicado em 10 de fevereiro de 2012. Disponível em: <<http://www.jornalcana.com.br/noticia/ProCana-Brasil/44467+NUMEROS-DO-SETOR-SUCROENERGETICO>>. Acesso em: julho de 2012.

QI, Y.; PAN, Y.; LAO F, FAN, L.; HE, H.; LIU, R.; WANG, Q.; LIU, S.; LIU, F.; LI, Q.; DENG, H. Genetic structure and diversity of parental cultivars involved in china mainland sugarcane breeding programs as inferred from DNA microsatellites. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 11, n. 11, p. 1794-1803, 2012.

RABELO, S.C. **Avaliação de desempenho do pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino para a hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar**. 2007. 180 p.

Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia Química, UNICAMP, Campinas, SP.

RABOIN, L.M.; OLIVEIRA, K.M.; LECUNFF, L.; TELISMART, H.; ROQUES, D.; BUTTERFIELD, M.; HOARAU, J.Y.; D'HONT, A. Genetic mapping in the high polyploid sugarcane using a biparental progeny: identification of a gene controlling stalk colour and new rust resistance gene. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 112, n. 7, p. 1382-1391, 2006.

RAE, A.L.; GROF, C.P.L.; CASU, R.E.; BONNETT, G.D. Sucrose accumulation in the sugarcane stem: pathways and control points for transport and compartmentation. **Field Crops Research**, v. 92, p. 159-168, 2005.

RAMSEY, J.; SCHEMSKE, D.W. Neopolyploidy in flowering plants. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 33, p. 589-639, 2002.

RAMSEY, J.; SCHEMSKE, D.W. Pathways, mechanisms and rates of polyploid formation in flowering plants. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 29, p. 467-501, 1998.

REFFAY, N.; JACKSON, P.A.; AITKEN, K.S.; HOARAU, J.Y.; D'HONT, A.; BESSE, P.; MCINTYRE, C.L. Characterization of genome regions incorporated from an important wild relative into Australian sugarcane. **Molecular Breeding**, v. 15, p. 367-381, 2005.

REID, J.S.G. Cementing the wall: cell wall polysaccharide synthesizing enzymes. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 3, n.6, p. 512-516, 2000.

REITER, W.D.; VANZIN, G.F. Molecular genetics of nucleotide sugar interconversion pathways in plants. **Plant Molecular Biology**, v. 47, n. 1-2, p. 95-113, 2001.

RIDESA. Confirma o censo varietal Brasil 2012. Disponível em: <<http://ridesa.agro.ufg.br/pages/44741>>. Acesso em: julho 2012.

RIDESA. Histórico. Disponível em <<http://ridesa.agro.ufg.br/pages/38059>>. Acesso em: janeiro 2013.

RIPOLI, T.C.C; RIPOLI, M.L.C; CASAGRANDE, D.V; IDE, B.Y. **Plantio de cana-de-açúcar: estado da arte**. 2 ed. rev. e ampl. Piracicaba: T. C. C. Ripoli, 2007. 198 p.

ROACH, B.T.; DANIELS, J. A review of the origin and improvement of sugarcane. In: COPERSUCAR INTERNATIONAL SUGARCANE BREEDING WORKSHOP, 1., 1987, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: Centro de Tecnologia Copersucar, 1987. p. 1-31.

RODRIGUES, J.D. **Fisiologia da cana-de-açúcar**. Botucatu: Instituto de Biociência, 1995. 101 p. (Apostila).

ROSSI, M.; ARAUJO, P.G.; VAN SLUYS, M.-A. Survey of transposable elements in sugarcane expressed sequence tags (ESTs). **Genetics and Molecular Biology**, v. 24, n. 1-4, p. 147-154, 2001.

ROLLAND, F.; BAENA-GONZALEZ E.; SHEEN, J. Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. **Annual Review Plant Biology**, v. 57, p. 675-709, 2006.

SACILOTO, R.F.Z. **Inserção do gene PR5K em cana-de-açúcar visando induzir resistência ao fungo da ferrugem *Puccinia melanocephala***. 2003. 74 p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP.

SALIBA, E.O.S.; RODRIGUEZ, N.M.; MORAIS, S.A.L.; PILÓ-VELOSO, D. Ligninas – métodos de obtenção e caracterização química. **Ciência Rural**, v. 31, n. 5, p. 917-928, 2001.

SCHÄFER, W.E.; ROHWER, J.M.; BOTHA, F.C. Partial purification and characterization of sucrose synthase in the sugarcane culm. **Journal of Plant Physiology**, v. 162, n.1, p. 11-20, 2005.

SCHÄFER, W.E.; ROHWER, J.M.; BOTHA, F.C. Protein level expression and localization of sucrose synthase in the sugarcane culm. **Physiologia Plantarum**, v. 121, n. 2, p. 187-195, 2004.

SCHALLER, F. Enzymes of the biosynthesis of octadecanoid derived signaling molecules. **Journal of Experimental Botany**, v. 52, p. 11-23, 2001.

SCHRÖDER, R.; ATKINSON, R.G.; REDGWELL, R.J. Re-interpreting the role of endo- β -mannanases as mannan endotransglycosylase/hydrolases in the plant cell wall. **Annals of Botany**, v. 104, n. 2, p. 197-204, 2009.

SEGATO, S.V.; PINTO, A.S.; JENDIROBA, E.; NÓBREGA, J.C.M. **Atualização em produção de cana-de-açúcar**. Piracicaba: Livroceres, 2006. 415 p.

SELVI, A.; NAIR, N.V.; BALASUNDARAM, N.; MOHAPATRA, T. Evaluation of maize microsatellite markers for genetic diversity analysis and fingerprinting in sugarcane. **Genome**, v. 46, n. 3, p. 394-403, 2003.

SEMBDNER, G.; PARTHIER, B. The biochemistry and the physiological and molecular actions of the jasmonates. **Annual Review of Plant Physiology Plant Molecular Biology**, v. 44, p. 569-589, 1993.

SHULER, M.L.; KARGI, F. **Bioprocess engineering – basic concepts**. New Jersey: Prentice Hall, 1992. 479 p. (Series in the Physical and Chemical Engineering Sciences).

SILVA, D.C.; DUARTE FILHO, L.S.C.; SANTOS, J.M.; BARBOSA, G.V.S.; ALMEIDA, C. DNA fingerprinting based on simple sequence repeat (SSR) markers in sugarcane clones from the breeding program RIDESA. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 21, p. 4722-4728, 2012.

SILVA, V.L.M.M.; GOMES, W.C.; ALSINA, O.L.S. Utilização do bagaço de cana-de-açúcar como biomassa adsorvente na adsorção de poluentes orgânicos. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 2, n. 1, p. 27-32, 2007.

SJÖSTRÖM, E. **Wood chemistry: fundamentals and applications**. 2.ed. San Diego: Academic Press, 1992. 269 p.

SMITH, M.A.; JONSSON, L.; STYMNE, S.; STOBAR, K. Evidence for cytochrome b₅ as an electron donor in ricinoleic acid biosynthesis in microsomal preparations from developing castor bean (*Ricinus communis* L.). **Biochemical Journal**, v. 287, p. 141-144, 1992.

SOBRAL, B.W.S.; BRAGA, D.P.V.; LAHOOD, E.S.; KEIM, P. Phylogenetic analysis of chloroplast restriction enzyme site mutations in the Saccharinae Griseb. subtribe of the Andropogoneae Dumort. tribe. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 87, n. 7, p. 843-853, 1994.

SOLTIS, D.E.; SOLTIS, P.S. Polyploidy: recurrent formation and genome evolution. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 14, p. 348-352, 1999.

SREENIVASAN, T.V.; JAGATHESAN, D. Meiotic abnormalities *Saccharum spontaneum* L. **Euphytica**, v. 24, p. 543-549, 1975.

STEBBINS, G.L. **Chromosomal evolution in higher plants**. Reading: Addison-Wesley, 1971. 216 p.

STICKLEN, M. Plant genetic engineering for biofuel production: towards affordable cellulosic ethanol. **Nature Reviews Genetics**, v. 9, p. 433-443, 2008.

STRUM, A.; CHRISPEELS, M.J. cDNA cloning of a carrot extracellular b-fructosidase and its expression in response to wounding and bacterial infection. **Plant Cell**, v. 2, p. 1107-1119, 1990.

SUNG, S.S.; XU, D.P.; BLACK, C.C. Identification of actively filling sucrose sinks. **Plant Physiology**, v. 89, p. 1117-1121, 1989.

SYBENGA, J. **Cytogenetics in plant breeding**. Berlin: Springer, 1992. 469 p.

THE ARABIDOPSIS GENOME INITIATIVE. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. **Nature**, v. 408, n. 6814, p. 796-815, 2000.

TAIZ, L.; ZIEGER, E. **Fisiologia vegetal**. 7.ed. Porto Alegre: Artemed, 2004. 720 p.

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**, v. 106, p. 411-422, 2003.

THOMSON, M.J.; SEPTININGSIH, E.M.; SUWARDJO, F.; SANTOSO, T.J.; SILITONGA, T.S.; McCOUCH, S.R. Genetic diversity analysis of traditional and improved Indonesian rice (*Oryza sativa* L.) germplasm using microsatellite markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 114, p. 559-568, 2007.

UKOSKIT, K.; THIPMONGKOLCHAROEN, P.; CHATWACHIRAWONG, P. Novel expressed sequence tag- simple sequence repeats (EST-SSR) markers characterized by new bioinformatic criteria reveal high genetic similarity in sugarcane (*Saccharum* spp.) breeding lines. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 6, p. 1337-1363, 2012.

UNICA. União da Indústria de Cana-de-Açúcar. Setor sucroenergético – Histórico. Disponível em < <http://www.unica.com.br/documentos.php> > Acesso em: 30 out. 2012.

UYS, L.; BOTHA, F.C.; HOFMEYR, J.H.S.; ROWER, J.M. Kinetic model sucrose accumulation in maturing sugarcane culm tissue. **Phytochemistry**, v. 68, p. 2375-2392, 2007.

VAN ZYL, W.H.; ROSE, S.H.; TROLLOPE, K.; GORGENS, J.F. Fungal β -mannanases: mannan hydrolysis, heterologous production and biotechnological applications. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 1203–1213, 2010.

VEASEY, E.A.; BORGES, A.; ROSA, M.S.; QUEIROZ-SILVA, J.R.; BRESSAN, E.A.; PERONI, N. Genetic diversity assessed with microsatellites in Brazilian sweetpotato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam) landraces. **Genetics and Molecular Biology**, v. 31, n. 3, p. 725-733, 2008.

VERMA, A.K.; UPADHYAY, S.K.; VERMA, P.C.; SOLOMON, S.; SINGH, S.B. Functional analysis of sucrose phosphate synthase (SPS) and sucrose synthase (SS) in sugarcane (*Saccharum*) cultivars. **Plant Biology**, v. 13, n.2, p. 325-332, 2011.

VORWERK, S.; SOMERVILLE, S.; SOMERVILLE, C. The role of plant cell wall polysaccharide composition in disease resistance. **Trends in Plant Science**, v. 9, p. 203-209, 2004.

WALKER, D.I.T. Trends in sugarcane breeding. In: ABBOTT, A.J., ATKIN, R.K. (eds.). **Improving vegetatively propagated crops**. London: Academic Press, 1987. p. 3-26.

WANG, J.; ROE, B.; MACMIL, S.; YU, Q.; MURRAY, J.; TANG, H.; CHEN, C.; NAJAR, F.; WILEY, G.; BOWERS, J.; VAN SLUYS, M.; ROKHSAR, D.; HUDSON, M.; MOOSE, S.; PATERSON, A.; MING, R. Microcollinearity between autopolyploid sugarcane and diploid sorghum genomes. **BioMed Central Genomics**, v. 11, n. 261, p. 1-17, 2010.

WATANABE, H.; ABE, K.; EMORI, Y.; HOSOYAMA, H.; ARAI, S. Molecular cloning and gibberellin-induced expression of multiple cysteine proteinases of rice seeds (oryzains). **The Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n. 25, p. 16897-16902, 1991.

WENDEL, J.F. Genome evolution in polyploids. **Plant Molecular Biology**, v. 42, p. 225-249, 2000.

WILLIAMS, L.E.; LEMOINE, R.; SAUER, N. Sugar transporters in higher plants – a diversity of roles and complex regulation. **Trends in Plant Science**, v. 5, p. 283-290, 2000.

WOLFE, K.H. Yesterday's polyploids and the mystery of diploidization. **Nature Reviews Genetics**, v. 2, p. 333-341, 2001.

WU, L.; BIRCH, R.G. Double sugar content in sugarcane plants modified to produce a sucrose isomer. **Plant Biotechnology Journal**, v. 5, p. 109-117, 2007.

WU, K.K.; BURNQUIST, W.; SORRELLS, M.E.; TEW, T.L.; MOORE, P.H. The detection and estimation of linkage in polyploids using single-dose restriction fragments. **Theoretical Applied Genetics**, v. 83, p. 294-300, 1992.

XU, Y.B.; CROUCH, J.H. Marker-assisted selection in plant breeding: from publications to practice. **Crop Science**, v. 48, p. 391-407, 2008.

ZHANG, P.; DREISIGACKER, S.; BUERKERT, A.; ALKHANJARI, A.; MELCHINGER, A.E. Genetic diversity and relationships of wheat landraces from Oman investigated with SSR markers. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 53, p. 1351-1360, 2006b.

ZHANG, Y.H.P.; HIMMEL, M.E.; MIELENZ, J.R. Outlook for cellulase improvement: screening and selection strategies. **Biotechnology Advances**, v. 24, p. 452- 481, 2006a.

ZHANG, Y.H.P.; LYND, L.R. Towards an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: non-complexed cellulase systems. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 88, p. 797-824, 2004.

ZHAO, H.; KWAK, J.H.; ZHANG, Z.C.; BROWN, H.M.; AREY, B.W.; HOLLADAY, J.E. Studying cellulose fiber structure by SEM, XRD, NMR and acid hydrolysis. **Carbohydrate Polymers**, v. 68, p. 2, p. 235-24.1, 2007.

ZHU, Y.J.; ALBERT, H.H.; MOORE, P.H. Differential expression of soluble acid invertase genes in the shoots of high-sucrose and low-sucrose species of *Saccharum* and their hybrids. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 27, p. 193-199, 2000.

ZHU, Y.J.; KOMOR, E.; MOORE, P.H. Sucrose accumulation in the sugarcane stem is regulated by the difference between the activities of soluble acid invertase and sucrose phosphate. **Plant Physiology**, v. 115, p. 609-616, 1997.

4 ARTIGO

MARCADORES MOLECULARES ESTs-SSRs DISCRIMINANTES PARA TEOR DE SACAROSE E FIBRA EM CANA-DE-AÇÚCAR

Natália A. Sanglard¹, Carlos Frederico M. Veiga², Marcio H.P. Barbosa³, Valdir Diola⁴

¹ Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada – Instituto de Biologia - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro - Seropédica (RJ), Brasil

² Campus Campos dos Goytacazes, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro- Campos dos Goytacazes (RJ), Brasil

³ Dep. de Fitotecnia, Universidade Federal de Viçosa – Viçosa(MG), Brasil

⁴ Dep. de Genética, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro - Laboratório de Genética e Melhoramento Vegetal- Seropédica (RJ), Brasil

RESUMO

A cana-de-açúcar constitui-se na principal fonte de produção de açúcar e etanol no Brasil. Visando atender o setor industrial, o melhoramento genético tem obtido cultivares com elevado rendimento. Porém, os avanços para a obtenção das variedades é limitada pela complexidade genética da planta. Novas estratégias e ferramentas moleculares precisam ser incorporadas aos programas de melhoramento visando reduzir os custos e tempo na obtenção de novas variedades. O objetivo deste estudo foi selecionar marcadores moleculares do tipo ESTs-SSRs associados com características fenotípicas de interesse. Foram fenotipadas e analisadas 81 progênies (T1) resultantes de um cruzamento biparental com genitores contrastantes para a característica de fibras e sacarose. A genotipagem foi realizada com a aplicação de oito combinações de primers ESTs-SSRs derivados de famílias gênicas conservadas. Inicialmente as progênies foram classificadas em 4 classes contendo 12 genótipos cada, portadores de características fenotípicas contrastantes para teores de açúcares e fibras. Posteriormente, segundo a análise do genótipo associado ao fenótipo, quatro combinações de primers foram selecionados e aplicados na população. Verificou-se que em média 12,5 locos foram amplificados a cada gene, e o conteúdo de informação do polimorfismo situou-se entre 0,51 e 0,66, evidenciando a hipervariabilidade dos genes alvos do melhoramento. A análise genotípica estruturou seis grupos genotípicos, coerentes com as análises fenotípicas apresentando divergência genotípica de ~0,15. O presente estudo mostrou que os ESTs-SSRs são eficientes em detectar a associação do genótipo ao fenótipo, e que esse caráter é controlado por combinações entre alelos específicos cujos quais contribuem ou afetam diferencialmente a expressão fenotípica.

Palavras chaves: polimorfismo, marcador funcional, genótipo associado ao fenótipo.

ABSTRACT

Molecular markers EST-SSRs for screening the sucrose and fiber contents in sugarcane. The sugarcane constitutes the main source of production of sugar and ethanol in Brazil. Aiming to fulfill the industrial sector, breeding has gotten cultivars with high yield, but the advances for obtaining of varieties is limited by the complexity of genetic and plant molecular tools. New strategies and molecular tools need to be incorporated into breeding

programs aiming to reduce costs and time to obtain new varieties. The aim of this study was to select molecular markers EST-SSRs associated with phenotypic traits of interest. Were phenotyped and analyzed 81 progenies (T1) of a biparental cross with contrasting parents for the characteristic fiber and sucrose. Genotyping was performed by applying eight primer combinations EST-SSRs derived of the conserved gene family. Initially the progenies were classified into 4 classes each containing 12 genotypes, patients with phenotypic characteristics contrasting levels of sugars and fibers. Subsequently, the analysis of the genotype associated with the phenotype, four primer combinations were selected and applied in the population. Verified that on average 12.5 loci were amplified for each gene, and the polymorphism contents information was between 0, 51 and 0.66, showing the hypervariability gene targets of improvement. Genotypic analysis structured 6 genotypic groups, consistent with phenotypic analyzes showing genetic divergence of ~ 0.15. The present study showed that the ESTs-SSRs are effective in detecting the association of genotype to phenotype, and that this trait is controlled by specific alleles combinations whose or which contribute differentially affect the phenotypic expression.

Key words: polymorphism, functional marker, genotype associated with the phenotype.

INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp. L., Poaceae) é a mais importante fonte de sacarose no mundo (LICHTENTHALER e PETERS, 2004). É uma alternativa para o desenvolvimento estratégico e econômico no desafio da geração de energia renovável, sustentável e limpa (LAM et al., 2009). Os variados usos possíveis da cana-de-açúcar como matéria-prima têm gerado aumento do interesse de produtores de vários países pela cultura (LAM et al., 2009). O Brasil é um país modelo no desenvolvimento e uso comercial da cultura. A base da produção de cana-de-açúcar integra a produção de açúcar e de etanol na mesma planta, reduzindo os custos de ambos os processos (CAMARGO, 2007). No entanto, aspectos econômicos e tecnológicos do cultivo e da cultura precisam ser compreendidos para atender as necessidades do setor sucroalcooleiro, entre os principais, os que envolvem o melhoramento genético visando a produtividade de sacarose e a qualidade de fibras. Estas características são parcialmente dependentes do manejo, entretanto a maior contribuição para é proveniente do conteúdo genético das modernas variedades.

A cana-de-açúcar deriva de uma série de cruzamentos interespecíficos entre *S. Officinarum* (2n=80) e *S. Spontaneum* (2n = 40-128), do qual derivou um genoma que sofreu sucessivas duplicações originando uma planta octaplóide, com 100 a 120 cromossomos distribuídos em 8 genomas básicos (D'HONT et al., 2008). A complexidade do genoma deve-se a sua poliploidia, ao desequilíbrio cromossômico em homeo(e)ologia, a segregação polissômica, às recombinações com duplicações de locos, aos múltiplos alelos e grandes famílias gênicas (WANG et al., 2010). Estas particularidades limitam significativamente o avanço do melhoramento clássico em razão da baixa estabilidade das progênies (UKOSKIT et al., 2012). A necessidade de uma resposta mais rápida e previsível exige integração dos métodos baseados no genótipo ligado ao fenótipo. Marcadores moleculares são ferramentas estratégicas para tais aplicações, especialmente aqueles ligados aos genes de interesse, e a expressão dos seus respectivos fenótipos. Marcadores moleculares podem explorar aleatoriamente o genoma inteiro ou sequências gênicas específicas, como é o caso dos ESTs-SSRs (*Expressed Sequence Tags-Simple Sequence Repeats*).

A fonte de prospecção destes marcadores moleculares são os bancos de dados de ESTs (ex. NCBI: www.ncbi.gov). Os microssatélites (sequências repetitivas) intergênicos podem discriminar o polimorfismo, tanto pela amplificação dos fragmentos como também em razão da diferenciado tamanho do amplicon (LIU et al., 2011). A análise de ESTs-SSRs é uma estratégia específica para o estudo da porção transcrita do genoma, ideal para análise de genomas grandes, complexos e altamente redundantes, como a cana-de-açúcar (GARSMEUR et al., 2011). Estes marcadores facilitam a discriminação de sequências alvos como locos gênicos ligados a caracteres de interesse agrônômico, especialmente em plantas poliplóides como a cana-de-açúcar (UKOSKIT et al., 2012).

Os ESTs-SSRs podem ser aplicados no mapeamento de ligação baseando-se na associação do genótipo/fenótipo (OLIVEIRA et al 2007), assim como na detecção das múltiplas interações dos alelos com os fenótipos (FICKLIN et al., 2010). Este tipo de abordagem tem como intenção a geração de marcadores moleculares que possuam interações entre a variação fenotípica observada com a variabilidade genotípica (DIOLA et al., *no prelo*), o que possibilita amplamente a aplicação dos mesmos na Seleção Assistida por Marcadores Moleculares (MAS- *Marker Assisted Selection*).

Outros estudos que abordaram a estratégia usando este tipo de marcador específico, buscando a associação com características agrônômicas de interesse, como sacarose e fibras em cana-de-açúcar. Destacam-se os estudos realizados por Da Silva e Bressiani (2005) que ao utilizarem ESTs relacionados ao metabolismo de carboidratos com sondas de RFLP, mapearam QTL's para teor de sacarose, mostrando que o gene da sacarose sintase apresentou um marcador associado ao POL% da cana. Pinto et al. (2010) também usaram sondas de RFLP para mapear ESTs relacionados aos genes de interesse para a detecção de QTLs relacionados aos caracteres de fibra. Pinto et al. (2011) encontraram 19, 18 e 12 marcadores ESTs-SSRs associados ao Brix, Pol e fibra, respectivamente.

Embora marcadores derivados de ESTs tenham sido identificados ligados a tais características, ainda é preciso uma maior exploração do potencial dos mesmos para que sejam diretamente aplicados aos programas de melhoramento. Portanto, o objetivo do presente estudo foi a obtenção de marcadores moleculares ESTs-SSRs discriminantes de genes potenciais controladores da biossíntese de sacarose e ou fibras em genótipos de cana-de-açúcar.

MATERIAL E MÉTODOS

Material genético: Foram analisadas 81 progênies de cana-de-açúcar cujas quais estavam implantadas nas áreas experimentais da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) em Conceição da Barra-ES (Brasil), na subunidade de pesquisa da RIDESA (Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento Sucroalcooleiro). A população de estudo foi composta pelas progênies em fase T1 derivada do cruzamento biparental com genitores contrastantes para a característica de fibras e sacarose.

Fenotipagem: Foram realizadas as análises de caracterização do teor de sacarose e dos teores de fibras em três repetições. O caldo foi extraído segundo o método da prensa hidráulica (TANIMOTO, 1964), empregando-se colmos previamente desintegrados e homogeneizados. Após a extração, as amostras foram submetidas às análises de Brix, Pol (SCHENEIDER, 1979), Açúcares Redutores (AR) e Açúcares Redutores Totais (ART), segundo LANE e EYNON (1934). O Brix e a Pol foram expressos em % de caldo. A fibra foi determinada em função do brix do caldo extraído da prensa hidráulica, peso do bagaço úmido (PBU) onde é peso úmido (g) do bagaço ou resíduo resultante da prensagem de 500 g de cana ou matéria-

prima, utilizando a equação para o estado do Rio de Janeiro: Fibra (%) = (0,1926 x PBU - 15,39).

Extração do DNA: Foi realizada a partir de tecidos foliares usando o método baseado no detergente CTAB (KEB-LLANES et al., 2002). As amostras foram quantificadas em espectrofotômetro, medidas pela absorbância das bases a 260nm e 280nm (FERREIRA e GRATAPAGLIA, 1998) e diluídas para uma concentração de 50 ng.µL⁻¹.

Obtenção dos primers: Os microssatélites funcionais (*ESTs-SSRs*) (Tabela 1) utilizados são semelhantes aos propostos por Pinto et al. (2004).

Tabela 1: Primers utilizados para as análises do polimorfismo relacionado ao genoma funcional.

Primer EST-SSR	Similaridade da ESTs com o NCBI	SSR	Sequência	TM (°C)
1,4bMEH	(1-4)β Manana Endohidrolase AC006234	(AC) ₂₁	ForCTAACCAGCAGCGTCACCAG RevAGGCCGAGGTTTTGTCTTTG	55
OFR	12-Oxofitodienoato redutase3 AJ278332	(CAG) ₅	For CCCACTTCTCCCCTCCCGTTCC Rev GTCATCGGCGCCAGCACCAC	61
PPC2C	utative protein phosphatase-2C AC018363	(CCA) ₅	For CGATCTCCCTCCTCCTCCTCCAATG Rev TCCACTCCACACCTGACCTGACCAC	61
CyTB5	Citocromo B5 CF675654	(TGCT)	ForTCCTCTTCTCCTCTTGTCTCTGGTG RevATCCTCCTCTGCTGCTCTCTCGTCTC	62
CysP	Cisteína proteinase Z97022	(GATA) ₁₄	For GATGCTTGGGTCTGATTTC Rev TCGCGTCCACCAATGAACC	56
PIP	Proteína intrínseca da membrana plasmática AF130975	(GGGC) ₅	For GATCTTATGGGTGGGTCCGTTCC Rev GCCGCCGGTGGTCTCCTTCT	60
DPB	Proteína de ligação ao DNA AB019235	(GGAT) ₆	For GGGACCTGAAGATGACTGC Rev TCCTGCCTGCCTCATCATAAC	54
PKL	Proteína quinase-like AL353814	(GGCC) ₃	For GAATGCCCTCCAGTCAAGTG Rev ACCATTGACACGGAAACTGC	54

Fonte de obtenção: Pinto et al. (2004).

Obtenção dos Marcadores Moleculares ESTs-SSRs: As reações de PCR foram realizadas inicialmente em um volume final de 15 µL, contendo 100 ng de DNA genômico, 0,25mM de cada dNTP, 1,0 U de enzima Taq DNA polimerase, 2,5µM de cada *primer* (*forward* e *reverse*) em tampão da enzima 1X e 1,5 mM de MgCl². As reações de PCR foram realizadas em 94°C por 3 min; 5 ciclos com 94°C por 1 min, 56°C (+1°C) por 1 min e 72 °C por 1min) seguido de 33 ciclos com 94°C por 30s, TM do conjunto de *primers* (tabela 1) por 45 s e 72°C por 45 s, seguido de uma extensão final a 72°C por 3 min. As amostras foram desnaturadas e os amplicons da PCR foram separados em gel de poliacrilamida a 6% (acrilamida: bisacrilamida – 19:1) em sistema eletroforético “Sequi-GenT” (*BioRad*) sob uma voltagem de 1800 a 2000V e 80 a 90 Watts por um período de 2 a 2,5 h. Para determinar o tamanho dos amplicons foi aplicado marcador de 100 pb. Na coloração foi empregado o método com nitrato de prata (CRESTE et al., 2001; BRITO et al., 2010).

Análise dos dados: O polimorfismo dos locos foi avaliado atribuindo valores 1 (um) para a presença da banda e 0 (zero) para ausência. O conteúdo de informação do polimorfismo (PIC – *Polymorphism Information Content*), proposto por Weir (1996), foi estimado em função do número de alelos detectados, da sua distribuição e frequência na população estudada. Os valores de PIC para cada loco foram determinados pela fórmula: $PIC = 1 - \sum P_{ij}^2$, onde; P_{ij} é a frequência do alelo “j” no marcador “i” (a soma se estende por todos os alelos), considerando o número de alelos detectados para cada gene em relação à frequência relativa de cada alelo no conjunto dos 81 genótipos. Para analisar a

informatividade do *primer*, foi calculado o índice de marca (IM), de acordo com Prasad et al. (2000), $IM = PIC \cdot \eta \cdot \beta$ onde; η refere-se ao número de alelos (bandas) e β é a proporção de bandas polimórficas para a combinação de *primer*. A probabilidade de confundimento e o poder discriminatório foram calculados de acordo com Tessier et al. (1999). A probabilidade de confundimento indica a probabilidade de que duas regiões aleatórias individuais do genoma entre as progênies apresentem bandas idênticas, calculada a partir da equação: $C_j = \sum_{i=1}^k P_i^2 [N \cdot P_i - 1] / (N - 1)$, onde P_i é a frequência do alelo e N é o número de acessos analisados. O poder discriminatório compara a eficiência dos marcadores para identificação varietal sendo considerada para cada *primer* e obtida aplicando a seguinte equação: $D_j = 1 - C_j$.

Para cada marcador polimórfico foi estimada a frequência alélica, variância (σ^2) e desvio padrão (σ) de cada loco dentro dos grupos heteróticos. O Z escore polinomial foi calculado para estimar a contribuição alélica e a fase de ligação (p-valor), pela fórmula: $Z = (0,5 - \sigma) \cdot 2$, onde a constante 0,5 refere-se a ausência de contribuição alélica (50% de presença e/ou ausência); σ , desvio padrão para o alelo específico e a constante 2 refere-se a distribuição polinomial bilateral do intervalo médio (0,5) (WEIR, 1996), considerando os valores inferiores a 0,5 com fase de repulsão progressivamente para 0 (zero) e em aproximação progressiva para valores tendendo a 1 (um).

A distância genética (D_A) segundo a matriz dos dados do polimorfismo foi estimada conforme Nei (1978), corrigida para amostras de tamanho pequeno. O método de agrupamento com média aritmética não ponderada (*UPGMA-Uniweighted Pair Group Method With Arithmetic Mean*), baseada no coeficiente de Jaccard (Jaccard, 1908) foi utilizado para construção do dendograma. Para dar um intervalo de confiança à árvore construída, o *bootstrap* (1000 repetições) foi realizado pelo programa STATISTICA 9.1, fornecendo a porcentagem de replicatas similares aos dados originais.

RESULTADOS

As análises estatísticas indicaram que entre 12 genótipos mais contrastantes para as características fenotípicas estudadas (percentual de fibras e teores de açúcares) apresentaram diferenças significativas entre as classes fenotípicas classificadas aos extremos, mas não entre os genótipos de mesma classe fenotípica (Teste F significativo a 5% de probabilidade: Suplemento I).

As médias observadas para as classes com as 12 progênies com maior teor de POL de cana (%) foi de 18,17% e os genótipos com menor teor de PC apresentaram médias de 14,31%. Para Fibras os valores foram de 15,61 e 9,76% respectivamente para o maior e o menor teor. Segundo a separação de médias utilizando o teste Duncan, existem diferenças significativas a 5% de probabilidade, indicando a variabilidade fenotípica para ambos os caracteres estudados (Tabela 2).

A análise genotípica feita com marcadores moleculares para os genótipos que compuseram as quatro classes fenotípicas contrastantes para PC e fibras, contendo 48 acessos, baseou-se na aplicação de oito combinações de *primers* ESTs-SSRs (Tabela 1) e gerou 128 amplicons, dos quais 126 se apresentaram polimorfismos (Tabela 3). O número de locos discriminados foi de 5 a 28 e em média 16 amplicons foram observados por conjunto de primers, como apresentado na figura 1 e na tabela 2.

Tabela 2: Médias observadas para classes com 12 progênies de cana-de-açúcar contrastantes para a característica de teor de pol de cana - PC (%) e Fibras (%).

Progênies RB UFRRJ	PC (%)		Progênies RB UFRRJ	PC (%)		Progênies RB UFRRJ	Fibras (%)		Progênies RB UFRRJ	Fibras (%)	
	Teores inferiores			Teores superiores			Teores inferiores			Teores superiores	
1	14,76	±0,75 cd	13	18,05	±0,05 ab	25	8,15	±0,15 cd	37	14,43	±0,43 ab
2	13,00	±0,005 cde	14	19,12	±0,12 a	26	9,06	±0,06 cd	38	15,02	±0,02 ab
3	13,82	±0,81 cde	15	18,21	±0,20 a	27	9,18	±0,18 cd	39	15,11	±0,10 ab
4	14,73	±0,72 cd	16	18,45	±0,55 a	28	9,19	±0,19 cd	40	15,35	±0,34 ab
5	14,74	±0,73 cd	17	18,54	±0,46 a	29	9,20	±0,20 cd	41	15,46	±0,46 a
6	13,93	±0,93 cde	18	18,27	±0,27 a	30	9,36	±0,36 cd	42	16,14	±0,16 a
7	14,62	±0,62 cd	19	18,70	±0,69 a	31	10,31	±0,30 c	43	16,19	±0,19 a
8	15,19	±0,19 c	20	17,37	±0,36 ab	32	10,33	±0,33 c	44	16,46	±0,46 a
9	14,34	±0,34 cd	21	17,76	±0,25 ab	33	10,42	±0,42 c	45	17,13	±0,13 a
10	14,11	±0,11 cd	22	18,07	±0,06 ab	34	10,42	±0,42 c	46	17,22	±0,22 a
11	14,11	±0,11 cd	23	17,44	±0,44 ab	35	11,02	±0,02 c	47	14,40	±0,40 ab
12	14,41	±0,41 cd	24	18,15	±0,14 a	36	10,50	±0,49 c	48	14,38	±0,38 ab
Médias	14,31	±0,65 B	Médias	18,17	±0,78 A	Média	9,76	±0,54 B	Médias	15,61	±0,74 A

Médias seguidas de mesmas letras não diferem estatisticamente entre genótipos segundo a separação de médias por Duncan a 5% de probabilidade

O conjunto de primers que apresentou maior número de amplicons foi CyTB5, com um padrão eletroforético amplamente distinto (Fig. 1), enquanto o PKL apresentou o menor número de locos (Tabela 3).

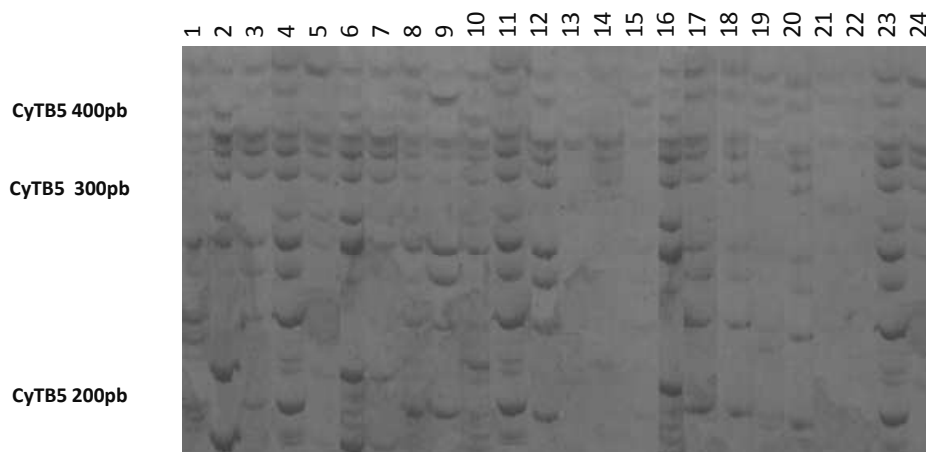


Figura 1. Padrão de eletroforese para os múltiplos alelos do gene da (CyTB5) (acesso do NCBI: CF675654), entre 300 e 500pb com demonstrando parte dos 28 alelos amplificados, todos polimórficos. Na parte superior da figura, estão as 24 progênies RB-UFRRJ(n): 1-12 (baixo teor de PC) e 13 a 24 (alto teor).

A frequência dos amplicons polimórficos, em cada conjunto de primers variou de 0,6 a 1,00, com média de 0,95. Os conjuntos de primers que melhor discriminaram a variabilidade genotípica foram CyTB5 (28), PP2C e CySP (24 locos em cada), porém o número de locos discriminados por genótipo para PC foi de 1 a 20, 4 a 15 e 3 a 16 locos respectivamente; enquanto que para fibra foi de 2 a 16, 4 a 15 e 1 a 17 locos. O tamanho médio dos amplicons para os locos foi de 587 pb facilitando a discriminação da variabilidade genética entre os genótipos (Tabela 3).

Tabela 3: Análise dos dados dos marcadores moleculares SSRs-ESTs segundo o polimorfismo apresentado para PC e fibra segundo as classes fenotípicas contendo 12 progênies em cada.

<i>Primers</i>	AT	AP	FAP	LI	AA (bp)	TMA (bp)	PIC	IM	C _j	D _j	Z score
EST-SSR	Parâmetros genotípicos para POL de Cana										
1,4bMEH	15	15	1,00	1-13	1500-200	743	0,66	3,37	0,13	0,87	0,303
OFR	7	7	1,00	1-5	1500-200	799	0,68	1,51	0,15	0,85	0,399
PPC2C	24	24	1,00	4-15	600-180	322	0,58	5,84	0,26	0,74	0,502
CysP	24	24	1,00	3-16	1500-140	537	0,63	5,59	0,18	0,82	0,523
PIP	16	16	1,00	1-15	2200-340	887	0,65	3,61	0,15	0,85	0,417
DPB	9	9	1,00	2-7	1000-410	634	0,43	2,21	0,44	0,56	0,468
PKL	5	3	0,60	2-6	500-280	377	0,36	1,15	0,40	0,60	0,528
CytB5	28	28	1,00	1-20	800-180	400	0,49	7,00	0,32	0,68	0,422
Total	128	126	0,95	2-12	1129-315	587	0,56	3,79	0,25	0,75	0,445
EST-SSR	Parâmetros genotípicos para os teores fibras										
1,4bMEH	15	15	1,00	3-9	1500-200	743	0,71	3,12	0,13	0,87	0,600
OFR	7	7	1,00	1-3	1500-200	799	0,88	0,73	0,02	0,97	0,571
PPC2C	24	24	1,00	1-15	600-180	322	0,68	5,20	0,14	0,86	0,550
CysP	24	24	1,00	1-17	1500-140	537	0,60	5,78	0,26	0,74	0,609
PIP	16	16	1,00	1-13	2200-340	887	0,72	3,22	0,11	0,89	0,404
DPB	9	9	1,00	1-7	1000-410	634	0,56	2,21	0,28	0,72	0,417
PKL	5	3	0,60	2-5	500-280	377	0,43	1,22	0,34	0,66	0,569
CyTB5	28	28	1,00	2-16	800-180	400	0,68	6,03	0,16	0,84	0,394
Total médias	128	126	0,95	2-11	1129-315	587	0,66	3,44	0,18	0,82	0,514

Abreviações: Amplicons totais (AT), amplicons polimórficos (AP), frequência de amplicons polimórficos (FAP), amplicons por indivíduo (AI), Amplitude alélica (AA), Tamanho Médio dos Amplicons (TMA), Conteúdo de informação do polimorfismo (PIC); Índice de Marca (IM), Probabilidade de Confundimento (C_j), Poder discriminatório (D_j).

Foram identificados 6 e 15 alelos raros (frequência alélica <0,05 na população) (dados não mostrados) para PC e Fibra, respectivamente. As menores frequências alélicas foram observadas em fibra para a combinação de *primers* PPC2C com 8 alelos raros, situando-se a uma faixa de 180 a 300 pb. Para os parâmetros genéticos, o PIC foi estimado para cada conjunto de primer foi de 0,36 a 0,68 para PC e entre 0,43 e 0,88 para fibra; com valores médios estimados em 0,56 e 0,67, respectivamente. Os índices de marca (IM) estimados entre 1,15 e 7,0 para PC e entre 0,73 e 6,03 para fibra, representativo do genoma poliplóide de cana-de-açúcar. O melhor IM foi obtido com o *primer* CyTB5, pois amplificou 28 locos, sendo 100% polimórficos, possibilitando a discriminação de todos as progênies.

A menor probabilidade de confundimento (C_j) para PC foi observada especialmente para o primer 1,4bMEH (0,13) e a maior em DPB (0,44), enquanto que para fibra a menor probabilidade de C_j foi para o primer OFR (0,02) e a maior em PKL (0,34) (Tabela 3). Em consequência do elevado C_j todos os primers analisados neste estudo apresentaram médio a alto poder discriminatório com valores que vão de 0,56 a 0,87 para PC e 0,66 até 0,97 para fibra (Tabela 3).

Quanto à análise de genotipagem associada ao fenótipo, para PC a maior associação foi evidenciada para o primer 1,4βMEH, no qual a presença de bandas associou-se à baixa expressividade do fenótipo (Z score 0,303) (Tabela 3). A presença dos amplicons de

1,4 β MEH mostaram que estão ligados a baixa concentração de PC nos genótipos analisados, destacando-se o amplicon de 350 pb (92,7% de probabilidade que a presença da banda codifica para um fenótipo de baixo PC). Este mesmo primer demonstrou que os amplicons de menor tamanho que 500pb indicam que a sua presença está fortemente ligado aos fenótipos que apresentaram elevados teores de fibras (87% de probabilidade). O primer PP2C foi o que evidenciou mais amplicons com contribuição para fase de ligação em atração, destacando-se os amplicons de 180 pb, 181 pb, 230 pb, 260 pb e 350 pb com probabilidade de 75%; 75%; 75%; 79% e 83% respectivamente, de que a presença da banda codifica para um fenótipo de alto teor de fibras. Os demais primers, DPB, OFR, PIP, PKL e CyTB5 apresentaram-se ligados a baixa produção de sacarose em cana assim como para fibra. Para fibra em OFR, o amplicon de 485 pb contribuiu para fase de ligação em atração (83% de probabilidade que a presença da banda codifica para um fenótipo de alto teor de fibras); e para CyTB5 o amplicon de 600 pb para PC contribuiu para fase de ligação em atração (71% de probabilidade que a presença da banda codifica para um fenótipo de alto PC).

A análise genotípica feita com marcadores moleculares para os genótipos da população toda, contendo os 81 acessos, baseou-se na aplicação de quatro combinações de primers ESTs-SSR (Tabela 4) selecionados de acordo com a contribuição alélica e a fase de ligação (Z score) apresentada na tabela 3.

Tabela 4: Análise dos dados dos marcadores moleculares ESTs-SSRs segundo o polimorfismo apresentado para 81 progênies.

<i>Primers</i>	AT	AP	FAP	AI	AA(bp)	TMA (bp)	PIC	IM	C _j	D _j	AR*
EST-SSR											
1,4 β MEH	17	15	0,88	1-15	1500-1200	743	0,66	3,38	0,15	0,85	1
DPB	9	9	1,00	1-7	1000-410	634	0,54	2,23	0,25	0,75	Não
CytB5	20	20	1,00	2-17	800-180	337	0,63	4,63	0,16	0,84	1
PKL	4	3	0,75	1-5	280-500	377	0,51	1,00	0,25	0,75	Não
Total	50	47	0,91	1-11	895-323	523	0,59	2,81	0,20	0,80	-

Abreviações: Amplicons totais (AT), locos polimórficos (AP), frequência de amplicons polimórficos (FAP), amplicons por indivíduo (AI), Amplitude alélica (AA), Tamanho Médio dos Amplicons (TMA), Conteúdo de informação do polimorfismo (PIC); Índice de Marca (IM), Probabilidade de Confundimento (C_j), Poder discriminatório (D_j). *Alelos Raros (AR); Frequência alélica entre 10 (0,1) e 20% (0,2) para cada loco específico (alelo específico).

Para os 81 acessos analisados foram gerados 50 amplicons específicos, dos quais 47 mostraram-se polimórficos. O número de amplicons discriminados foi de 4 a 20 e em média 12,5 foram observados por conjunto de primer como observado na tabela 4. O conjunto de primers que apresentou o maior número de amplicons foi o CyTB5, enquanto PKL apresentou o menor número de amplicons (Tabela 4). A frequência dos locos polimórficos em cada conjunto de primers variou de 0,75 a 1,00, com média de 0,91, indicando que os genótipos são diferentes e apresentam ampla variabilidade genética (Tabela 4). Os conjuntos de primers que melhor discriminaram a variabilidade genotípica foram CyTB5 (20) e 1,4 β MEH. O número de amplicons discriminados por genótipo foi de 2 a 17 e 1 a 15, respectivamente. O tamanho médio dos amplicons para os locos foi de 523 pb.

Para os parâmetros genéticos, o PIC foi estimado entre 0,51 e 0,66 com valor médio de 0,59; o índice de marca (IM) entre 1,00 e 4,63. O melhor IM foi obtido com o primer CyTB5, pois amplificou 20 fragmentos genômicos, sendo 100% polimórficos. A menor probabilidade de confundimento (C_j) foi observada para o primer 1,4 β MEH (0,14) e o maior para DPB e

PKL com 0,25 em ambos (Tabela 4). Alelos raros não foram detectados (<0,05); sendo que as menores frequências alélicas foram observadas tanto para a combinação de *primers* 1, 4bMEH como para CyTB5 com 1 alelo relativamente raro.

A análise discriminatória de similaridade genética (segundo a genotipagem) da população de estudo (81 genótipos) demonstrou a existência de grupos heterológicos associados com características fenotípicas específicas. A estatística multivariada baseada em análise de cluster gerou a formação de seis distintos grupos com divergência genotípica relativa de aproximadamente 15% (barra de corte ~0,15) entre si (Figura 2).

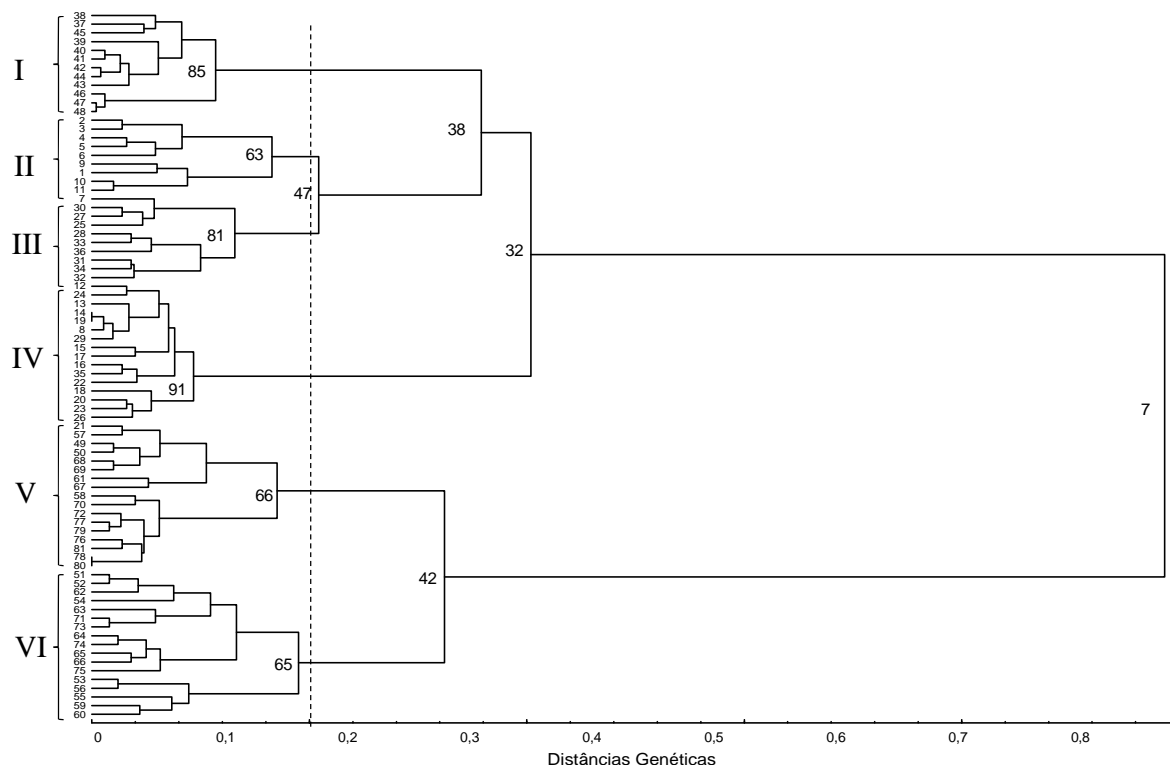


Figura 2. Dendrograma para o padrão de dissimilaridade genética estabelecida pelo método UPGMA, com base nos coeficientes de Jaccard, em cluster hierarquizado e os componentes de cada grupo para os 81 progênies de cana-de-açúcar.

O grupo I foi formado predominantemente por progênies que apresentaram alto teor de fibra; o grupo II representado por progênies com baixo teor de sacarose; no grupo III o fenótipo mais evidente é o baixo teor fibras e para o grupo IV alto teor de sacarose. As demais progênies agruparam-se em dois grupos (V e VI) cujos fenótipos para PC e fibras foram considerados valores intermediários.

A menor distância genética entre os grupos formados ocorreu entre o grupo II (baixo teor de sacarose) e III (baixo teor de fibras), com valores menores de 0,05; enquanto que a maior distância foi evidenciada para o agrupamento I (alto teor fibras) e IV (elevado teor de sacarose), apresentando dissimilaridade genética entre si de 0,25.

Na Figura 2 encontra-se o dendrograma obtido com a utilização da função da matriz de dados binários de 50 locos depois da obtenção da matriz de distâncias segundo as médias gerais. Os pontos de corte considerados foram aqueles em que $\alpha = 0,05$ e resultaram em diferentes agrupamentos com $\beta = 1000$ reamostragens (*bootstrap*). Os números nos nós do dendrograma indicam o valor da porcentagem de vezes que o grupo ocorreu no mesmo nó

durante o *bootstrap* de 1000 repetições. Marcadores 1,4 β MEH contribuíram para formação dos grupos I e III, caracterizadas fenotipicamente pelo alto e baixo teor fibras.

DISCUSSÃO

A indicação da variabilidade fenotípica para ambos os caracteres estudados (percentual de fibras e teores de açúcares) segundo a separação de médias pelo teste Duncan é um resultado esperado no presente trabalho. Tal teste é um procedimento sequencial válido para a totalidade dos contrastes de duas médias. Quando a maior média não diferir significativamente da menor, não se admitirá diferença significativa, entre as médias intermediárias. Foi evidenciada a separação das médias entre os grupos diferenciadores, tanto para PC como para fibras, pois um grande número de genótipos intermediários foram excluídos da análise. Resultados estatísticos semelhantes foram observados por Creste et al. (2010) ao analisar a divergência genética entre genótipos de cana-de-açúcar. Diante destas diferenças fenotípicas procedeu-se as análises seguintes de genotipagem dos indivíduos com os marcadores genes específicos, os quais também se mostraram bons discriminantes genotípicos.

Este trabalho mostrou que os marcadores ESTs-SSR foram eficientes na detecção de múltiplos alelos para um mesmo gene, razão da poliploidia da cana-de-açúcar, especialmente porque usando análise de bioinformática foram selecionados genes alvos com múltiplos alelos. Liu et al. (2011) também evidenciaram estes resultados e atribuíram este fato a poliploidia e a duplicação de genes. Nossos marcadores partiram das premissas derivadas de outros estudos que obtiveram sucesso de amplificação de vários locos citando-se Thiel et al. (2003), Nicot et al. (2004), Oliveira et al. (2007; 2009), todos em cana-de-açúcar. Resultados similares foram obtidos por Diola et al. (*no prelo*) na análise de uma população mista derivada de genitores desconhecidos usando um conjunto de primers similares aos utilizados neste estudo. Estes autores identificaram alelos específicos ligados à expressão fenotípica de caracteres como a estrutura das plantas, acúmulo de sólidos solúveis totais e biomassa, gerando informações do genótipo associado ao fenótipo.

Os marcadores moleculares foram eficientes na discriminação genotípica das progênes, porém inferior àquelas observadas por outros autores (PIPERIDIS et al., 2001), (CORDEIRO et al., 2003), (PINTO et al., 2006) e (OLIVEIRA et al., 2009), os quais utilizaram marcadores microssatélites genômicos (gSSRs) em cana-de-açúcar. Marcadores gSSRs se encontram em regiões não codificantes do genoma, sendo com isso menos influenciados pela seleção natural ou artificial, permitindo que a variabilidade genética possa ser mais ampla, facilitando a detecção de locos raros e aumenta o poder discriminatório do marcador (WANG et al., 2010), permitindo uma rápida genotipagem mesmo grandes populações. Este fato também contribui para a evidência de poucos alelos raros em nosso estudo, pois a seleção pode ter atuado sobre genes alvos ligados a síntese de sacarose ou fibras, reduzindo a frequência de alelos raros nas populações melhoradas.

Um parâmetro genotípico amplamente utilizado é o PIC que varia de 0 a 1. Vários estudos com marcadores ESTs-SSRs em cana-de-açúcar estimaram valores significativos de PIC para genotipagem. Liu et al. (2011) obtiveram valores de até 0,9; Marconi et al. (2011) com até 0,92; Oliveira et al. (2009) de até 0,94, e Duarte Filho et al. (2010), usando gSSRs, estimaram valores de 0,34 e 0,78. PIC com valor elevado é resultante da baixa frequência do alelo na população e conseqüentemente maior poder de discriminação genotípica. O presente estudo mostrou uma menor amplitude de variação do PIC, pois a análise trata de uma população de progênes obtidas visando a seleção para açúcares e fibras.

Foi evidenciada amplamente a existência de uma grande variabilidade de alelos para um mesmo gene; a hipervariabilidade pode ser derivada da poliploidia e das duplicações de regiões cromossômicas contendo alelos que contribuí efetivamente para a manutenção da heterose em plantas autopoliploides, mesmo que seja alógamas, como é o caso da cana-de-açúcar (GRIFFITHS et al., 2004; AUGER et al., 2005; YU et al., 2005).

A validação dos parâmetros genotípicos ocorre quando estatisticamente encontram-se resultados que indicam para uma tendência comum. Além dos valores de associação do genótipo ao fenótipo, no presente trabalho os genótipos foram agrupados pelo seu padrão de bandejamento eletroforético individual, porém, ordenando em grupos de característica fenotípica comum. A utilização das análises multivariadas e a obtenção do dendograma baseado na metodologia UPGMA, gerando grupos heterólogos com associação do genótipo ao fenótipo é uma nova estratégia para avaliar a dissimilaridade genotípica visando a aplicabilidade do marcador em programas de melhoramento. Vários autores realizaram análises de discriminação da similaridade genética entre genótipos de cana-de-açúcar (AITKEN, JACKSON e McINTYRE, 2006; CRESTE et al., 2010; UKOSKIT et al., 2012), porém sem a associação com respectivos fenótipos. A metodologia aplicada nesse estudo foi prontamente eficiente na discriminação genotípica de grupos heterólogos segundo os marcadores discriminantes de 1,4 β MEH e PKL que detectam alelos específicos de genes alvos, pois contribuíram para formação dos grupos I e III, os quais representam melhor as progênies que foram caracterizadas fenotipicamente pelo alto e baixo teor fibras, respectivamente. Os marcadores 1,4 β MEH de tamanho inferiores a 550 pb discriminaram as características de baixa produção de sacarose e elevados teores de fibras. Tais genes estão potencialmente ligados à elongação da parede celular e crescimento vegetativo. Schröder et al. (2009) caracterizaram o gene da (1-4) β -manana endohidrolase e mostraram que a enzima atua sobre os constituintes de hemiceluloses na parede celular, tornando-as mais espessas, porém mais flexíveis.

Portanto, o presente estudo que caracterizou a análise do genótipo associado ao fenótipo apresenta um grande potencial para a aplicação em MAS (*Marker Assisted Selection*), uma vez que foi capaz de indicar os locos específicos ou conjuntos de locos que de fato contribuem ou reprimem a expressão fenotípica, seja para alto ou baixo teor de fibras ou sacarose nas progênies avaliadas. A estratégia descrita aqui pode ser expandida para outras características alvos de interesse agrônômico cujo objetivo seja atender as demandas do melhoramento genético, na intenção de melhorar a eficiência de seleção e reduzir o tempo de obtenção de novas variedades de cana-de-açúcar.

CONCLUSÕES

O conjunto de primers ESTs-SSRs selecionados foi eficiente em detectar um elevado número de amplicons em cana de açúcar, em sua maioria, polimórficos e as análises genéticas aplicadas foram capazes de gerar informações de associação do genótipo ligado ao fenótipo.

O presente estudo mostrou que o caráter fenotípico pode ser mais eficientemente controlado por combinações específicas de amplicons de que pelo conjunto total de alelos; Os marcadores 1,4 β MEH de tamanho inferiores a 550 pb foram os que mais contribuíram para a manifestação fenotípica. A presença destes amplicons indicou que provavelmente as progênies são pouco produtoras de sacarose e boas acumuladoras de fibras.

AGRADECIMENTOS

À RIDESA pela parceria e concessão de uso do germoplasma de cana-de-açúcar.

REFERÊNCIAS

AITKEN, K.S.; JACKSON, P.A.; McINTYRE, C.L. Quantitative trait loci identified for sugarrelated traits in a sugarcane (*Saccharum* spp.) cultivar x *Saccharum officinarum* population. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 112, n. 7, p. 1306-1317, 2006.

AUGER, D.L.; GRAY, A.D.; REAM, T.S.; KATO, A.; COE, E.H.; BIRCHLER, J.A. Nonadditive gene expression in diploid and triploid hybrids of maize. **Genetics**, v. 169, p. 389-397, 2005.

BRITO, G.G.; CAIXETA, E.T.; GALLINA, A.P.; ZAMBOLIM, E.M.; ZAMBOLIM, L.; DIOLA, V.; LOUREIRO, M.E. 2010. Inheritance of coffee leaf rust resistance and identification of AFLP markers linked to the resistance gene. **Euphytica**, v. 173, n. 2, p. 255-264, 2010. doi 10.1007/s10681-010-0119-x.

CAMARGO, P.D. Força verde: um novo campo para a indústria química. **Revista Brasileira de Engenharia Química**, p. 18-21, 2007.

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

CRESTE, S.; TULMANN NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.19, p.299-306, 2001.

CRESTE, S.; ACCORONI, K.A.G.; PINTO, L.R.; VENCOVSKY, R.; GIMENES, M.A.; XAVIER, M.A.; LANDELL, M.G.A. Genetic variability among sugarcane genotypes based on polymorphisms in sucrose metabolism and drought tolerance genes. **Euphytica**, v. 172, n. 3, p. 435-446, 2010. doi: 10.1007/s10681-009-0078-2.

DA SILVA, J.A.G.; BRESSIANI, J.A. Sucrose synthase molecular marker associated with sugar content in elite sugarcane progeny. **Genetics and Molecular Biology**, v. 28, n. 2, p. 294-298, 2005. doi: org/10.1590/S1415-47572005000200020.

D'HONT, A.; SOUZA, G.M.; MENOSSE, M.; VINCENTZ, M.; VAN-SLUYS, M.A.; GLASZMANN, J.C.; ULIAN, E. C. Sugarcane: a major source of sweetness, alcohol, and bio-energy. In: MOORE, P.; MING, R. (eds.). **Genomics of tropical crop plants**. New York: Springer, 2008. Cap.21, p. 483-513. (Plant Genetic/Genomics, v.1).

DIOLA, V.; FERNANDES, E.C.; BARBOSA, M.H.P.; BRITO, G.G.; SANGLARD, N.A.; VEIGA, C.F.M. Detection of multiple alleles and genotyping-phenotype associated in sugarcane using ESTs-SSR. (*no prelo* - submetido para publicação Plant Breeding).

DUARTE FILHO, L.S.C.; SILVA, P.P.; SANTOS, J.M.; BARBOSA, G.V.S.; RAMALHONETO, 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**, v. 12, n. 2, p. 145-149, 2010. doi:10.1007/s12355-010-0028-2.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2.ed. Brasília: EMBRAPA CENARGEN, 1998. 220p.

FICKLIN, S. P.; LUO, F.; FELTUS, F.A. The association of multiple interacting genes with specific phenotypes in rice (*Oryza sativa*) using gene co-expression networks. **Plant Physiology**, v. 154, n. 1, p. 13-24, 2010. <http://dx.doi.org/10.1104/pp.110.159459>.

GARSMEUR, O.; CHARRON, C.; BOCS, S.; JOUFFE, V.; SAMAIN, S.; COULOUX, A.; DROC, G.; ZINI, C.; GLASZMANN, J.C.; VAN SLUYS, M.A. High homologous gene conservation despite extreme autopolyploid redundancy in sugarcane. **New Phytologist**, v.189, n.2, p. 629-642, 2011. doi: 10.1111/j.1469-8137.2010.03497.x.

GRIFFITHS, A.J.F.; GELBART, W.M.; LEWONTIN, R.C.; WESSLER, S.R.; SUZUKI, D.T.; MILLER, J.H. **An introduction to genetic analysis**. 8.ed. New York: W.H. Freeman & Company, 2004. 800 p.

JACCARD, P. Nouvelles recherches sur la distribution florale. **Bulletin de la Société Vandoise des Sciences Natureles**, v. 44, p. 223-270, 1908.

KEB-LLANES, M.; GONZÁLEZ, G.; CHI-MANZANERO, B.; INFANTE, D.A. Rapid and simple method for small-scale DNA extraction in agavaceae and other tropical plants. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 20, p. 299a-299e, 2002. doi: 10.1007/BF02782465.

LAM, E.; SHINE JR, J.; DA SILVA, J.; LAWTON, M.; BONOS, S.; CALVINO, M.; CARRER, H.; SILVA-FILHO, M.C.; GLYNN, N.; HELSEL, Z.; MA, J.; RICHARD JR, E.; SOUZA, G.M., MING, R. Improving sugarcane for biofuel: engineering for an even better feedstock. **Global Change Newsletter**, v. 1, n.3, p. 251-255, 2009. doi: 10.1111/j.1757-1707.2009.01016.x.

LANE, J. H.; EYNON, L. **Determination of reducing sugars by Fehling solution with methylene blue indicator**. London: Norman Rodger, 1934. 8p.

LICHTENTHALER, F.W.; PETERS, S.C.R. *Chimie*, v. 7, n. 2, p. 65-90, 2004.

LIU, P.; QUE, Y.; PAN, Y.; HIGHLY. Polymorphic microsatellite DNA markers for sugarcane germplasm evaluation and variety identity testing. **Sugar Tech**, v. 13, n. 2, p. 129-136, 2011. doi: 10.1007/s12355-011-0077-1.

MARCONI, T.G.; COSTA, E.A.; MIRANDA, E.R.; MANCINI, M.C.; CARDOSO-SILVA, C.B.; OLIVEIRA, K.M.; PINTO, L.R.; MOLLINARI, M.; GARCIA, A.A.F.; SOUZA, A.P. Functional markers for gene mapping and genetic diversity studies in sugarcane. **BMC Research Notes**, v. 4, p. 264, 2011. doi:10.1186/1756-0500-4-264.

NICOT, N.; CHIQUET, V.; GANDON, B.; AMILHAT, L.; LEGEAI, F.; LEROY, P. Study of simple sequence repeat (SSR) markers from wheat expressed sequence tags (ESTs).

Theoretical and Applied Genetics, v. 109, n.4, p. 800-805, 2004. doi:10.1007/s00122-004-1685-x.

OLIVEIRA, K.M.; PINTO, L.R.; MARCONI, T.G.; MARGARIDO, G.R.A.; PASTINA, M.M.; TEIXEIRA, L.H. Functional genetic linkage map based on EST-markers for a sugarcane (*Saccharum* spp.) commercial cross. **Molecular Breeding**, v. 20, n.3, p. 189-208, 2007. doi:10.1007/s11032-007-9082-1.

OLIVEIRA, K.M.; PINTO, L.R.; MARCONI, T.G.; MOLLINARI, M.; ULIAN, E.C. S. M.; CHABREGAS, S.M.; FALCO, M.C.; BURNQUIST, W.; GARCIA, A.A.F.; SOUZA, A.P. Characterization of new polymorphic functional markers for sugarcane. **Genome**, v. 52, n. 2, p. 191-209, 2009. doi: 10.1139/G08-105.

PINTO, L.R.; OLIVEIRA, K.M.; ULIAN, E.C.; GARCIA, A.A.F.; DE SOUZA, A.P. Survey in the sugarcane expressed sequence tag database (SUCEST) for simple sequence repeats. **Genome**, v. 47, n.5, p. 795-804, 2004. doi: 10.1139/G04-055.

PINTO, L.R.; OLIVEIRA, K.M.; MARCONI, T.; GARCIA, A.A.F.; ULIAN, E.C.; SOUZA, A.P. Characterization of novel sugarcane expressed sequence tag microsatellites and their comparison with genomic SSRs. **Plant Breeding**, v. 125, n. 4, p. 378–384, 2006. doi: 10.1111/j.1439-0523.2006.01227.x.

PINTO, L.R.; GARCIA, A.A.F.; PASTINA, M.M.; TEIXEIRA, L.H.M.; BRESSIANI, J.A.; ULIAN, E.C.; BIDOIA, M.A.P.; SOUZA, A.P. Analysis of genomic and functional RFLP derived markers associated with sucrose content, fiber and yield QTLs in a sugarcane (*Saccharum* spp.) commercial cross. **Euphytica**, v. 172, n.3, p. 313-327, 2010. doi: 10.1007/s10681-009-9988-2.

PINTO, L.R.; LEITE, D.C.; FAVERO, T.M.; PASTINA, M.M.; GARCIA, A.A.F.; PERECIN, D.; GONÇALVES, B.S.; CRESTE, S.; XAVIER, M.A.; BIDOIA, M.A.P.; LANDELL, M.G.A.; DE SOUZA, A. P. Identification of microsatellites markers associated with yield components and quality parameters in sugarcane. **International Sugar Journal**, v. 113, n. 1346, p. 140-144, 2011.

PIPERIDIS, G.; TAYLOR, G.O.; SMITH, G.R. **Meeting International Society of Sugarcane Technologists**. Proceedings of the XXIV Congress, Brisbane, Australia, p.17-21, 2001.

PRASAD, M.; VARSHNEY, R.K.; ROY, J.K.; BALYA, H.S.; GUPTA, P.K. The use of microsatellites for detecting DNA polymorphism, genotype identification and genetic diversity in wheat. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.100, n.3-4, p.584-592, 2000. . doi: 10.1007/s001220050077.

SCHENEIDER, F. **Sugar analysis: ICUMSA methods**. Norwich: ICUMSA, 265p. 1979.

SCHRÖDER, R.; ATKINSON, R.G.; REDGWELL, R.J. Re-interpreting the role of endo-b-mannanases as mannanendotransglycosylase/hydrolases in the plant cell wall. **Annals of Botany Company**, v. 104, n. 2, p. 197-204, 2009. doi: 10.1093/aob/mcp120

TANIMOTO, T. The press method of cane analysis. **Hawaiian Planter's Record**, v.57, p. 133-150, 1964.

TESSIER, C.; DAVID, J.; THIS, P.; BOURSICQUOT, J.M.; CHARRIER, A. Optimization of the choice of molecular markers for varietal identification in *Vitis vinifera* L. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 98, n.1, p. 171-177, 1999. doi: 10.1007/s001220051054.

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**, v. 106, p. 411-422, 2003. doi: 10.1007/s00122-002-1031-0.

UKOSKIT, K.; THIPMONGKOLCHAROEN, P.; CHATWACHIRAWONG, P. Novel expressed sequence tag- simple sequence repeats (EST-SSR) markers characterized by new bioinformatic criteria reveal high genetic similarity in sugarcane (*Saccharum* spp.) breeding lines. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 6, p. 1337-1363, 2012. doi: 10.5897/AJB11.1509.

VETTORE, A.L.; DA SILVA, F.R. ;KEMPER, E.L.; SOUZA, G.M.; DA SILVA, A.M.; FERRO, M.I.; HENRIQUE-SILVA, F.; GIGLIOTIm, E.A.; LEMOS, M.V.; COUTINHO, L.L.; NOBREGA, M.P.; CARRER, H.; FRANCA, S.C.; BACCI-JUNIOR, M.; GOLDMAN, M.H.; GOMES, S.L.; NUNES, L.R.; CAMARGO, L.E.; SIQUEIRA, W.J.; VAN SLUYS, M.A.; THIEMANN, O.H.; KURAMAE, E.E.; SANTELLI, R.V.; MARINO, C.L.; TARGON, M.L.; FERRO, J.A.; SILVEIRA, H.C.; MARINI, D.C.; LEMOS, E.G.; MONTEIRO-VITORELLO, C.B.; TAMBOR, J.H.; CARRARO, D.M.; ROBERTO, P.G.; MARTINS, V.G.; GOLDMAN, G.H.; DE OLIVEIRA, R.C.; TRUFFI, D.; COLOMBO, C.A.; ROSSI, M.; DE ARAUJO, P.G.; SCULACCIO, S.A.; ANGELLA, A.; LIMA, M.M.; DE ROSA JUNIOR, V.E.; SIVIERO, F.; COSCRATO, V.E.; MACHADO, M.A.; GRIVET, L.; DI MAURO, S.M.; NOBREGA, F.G.; MENCK, C.F.; BRAGA, M.D.; TELLES, G.P.; CARA, F.A.; PEDROSA, G.; MEIDANIS, J.; ARRUDA, P. Analysis and functional annotation of an expressed sequence tag collection for tropical crop sugarcane. **Genome Research**, v. 13, n.12, p. 2725-2735, 2003.

WANG, J.; ROE, B.; MACMIL, S.; YU, Q.; MURRAY, J.; TANG, H.; CHEN, C.; NAJAR, F.; WILEY, G.; BOWERS, J.; VAN SLUYS, M.; ROKHSAR, D.; HUDSON, M.; MOOSE, S.; PATERSON, A.; MING, R. Microcollinearity between autopolyploid sugarcane and diploid sorghum genomes. **BMC Genomics**, v. 11, n.261, p. 261, 2010. doi: 10.1186/1471-2164-11-261.

WEIR, B.S. **Genetic data analysis II**.2.ed. rev. and exp. Sunderland: Sinauer Associates, 445p, 1996.

YU, C.Y.; HU, S.W.; ZHAO, H.X.; AND GUO, A.G. Genetic distances revealed by morphological characters, isozymes, protein and RAPD markers and their relationships with hybrid performance in oilseed rape (*Brassica napus* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 110, p. 511–518, 2005. doi:10.1007/s00122-004-1858-7.

SUPLEMENTOS

SUPLEMENTO I

Parâmetros dos testes estatísticos da Anova fator simples com três repetições por genótipos a partir dos grupos fenotípicos distintos formando classes com 12 indivíduos contrastantes para os teores de fibra e açúcares

<i>Fonte da variação</i>						
<i>(PC %)</i>	<i>SQ</i>	<i>Gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	287,85	23	12,51	55,26	4,71E-27	1,75
Dentro dos grupos	10,86	48	0,22			
Total	298,72	71				

<i>Fonte da variação</i>						
<i>(Fibras %)</i>	<i>SQ</i>	<i>Gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	672,63	23	29,24	312,57	1,16E-44	1,75
Dentro dos grupos	4,49	48	0,09			
Total	677,12	71				

SUPLEMENTO II

Progenies com a identificação RB-UFRRJ (n), seguida dos prováveis genitores organizados segundo a estruturação do cluster do dendograma apresentado na figura 2.

Grupo I 12⁺ Fibra	Grupo II 12⁺ PC	Grupo III 12⁺ Fibra	Grupo IV 12⁺ PC	Grupo V Restante população	Grupo VI Restante população
38- RB943359X RB971537	2- RB867515 X?	30- RB855563 X ?	24- RB855563 X ?	21- RB936001 X RB965586	51- RB835486 X RB931604
37- RB867515	3- RB957712 X RB 945954	27- RB957610 X RB93522	13- RB855563 X ?	57- RB945065 X RB925345	52- RB956911 X ?
45- RB945065 X RB855035	4- RB855036 X ?	25- 498 X F150	14- RB955970 X ?	49- LAICA 98208 X RB855036	62- RB956911 X ?
39- RB855036 X ?	5- RB955970 X ?	28- RB965911 X SP832847	19- RB835486	50- RB945961 X RB957751	54- 457712 X RB93522
40- P 72454	6- RB945957 X RB855127	33- P X RB72454	8- RB855563 X ?	68- RB855563 X ?	63- RB855036 X ?
41- RB957610 X RB93522	9- RB945964 X SP911049	36- P RB867515	29- RB956911 X ?	69- RB855036 X ?	71- RB855036 X ?
42- RB72454 X RB855035	1- RB896342 X RB92508	31- RB945065 X ?	15- RB92606 X SP832847	61- RB845481 X RB945961	73- RB915141 X RB855322
43- RB945956 X RB947501	10- RB72454 X RB857511	34- RB925345 X RB91514	17- ?	67- RB72454 X ?	64- RB957610 X RB93522
46- RB971537 X RB943339	11- RB855036 X ?	32- RB955970 X?	16- RB92606 X SP832847	58- 806043 X ?	74- RB967610 X RB93522
47- RB947501 X RB9572	7- RB855563X?	12- RB855036 X?	35- SP832847 XRB 838520	70- RB835486 X RB835089	65- RB945961 X RB957751
48- ?			22- P RB867515 RB945961 X	72- RB956911 X ? RB957751	66- RB855663 X? 75- RB72454 X RB855035
			18- RB855036 X?	79- RB9557 X RB855511	53 - RB956911 X ?
			20- RB945961 X RB957751	76- RB72454 X RB855035	56- RB855563 X?
			23- RB867515	81- 945956 X ?	55- RB945956 X ?
			26- RB915141 X SP891115	78- RB945961 X RB957751	59- RB855036 X?
				80- M 945961 X RB957751	60- RB803280 X?

Nota. (?): progenitor desconhecido

SUPLEMENTO III Valores de Escore Z para as oito combinações de primers ESTs-SSRs, indicando a fase de ligação gênica em atração ou repulsão com o fenótipo correspondente.

1,4 BMEH	Z PC	Z Fibra	DPB	Z PC	Z Fibra	CyTB5	Z PC	Z fibra	PKL	Z PC	Z Fibra	PIP	Z PC	Z Fibra	OFR	Z PC	Z Fibra	CysP	Z PC	Z Fibra	PP2C	Z PC	Z Fibra
1500 pb	0,333	0,417	1000pb	0,458	0,500	800 pb	0,292	0,500	500 pb	0,375	0,625	2220 pb	0,333	0,291	1500 pb	0,542	0,5	1510 pb	0,708	0,6666	600 pb	0,5	0,500
1400 pb	0,375	0,417	950 pb	0,583	0,500	750 pb	0,458	0,500	350 pb	0,667	0,500	2045 pb	0,333	0,208	1490 pb	0,458	0,416	1500 pb	0,583	0,666	484 pb	0,583	0,500
1350 pb	0,458	0,458	660 pb	0,625	0,417	720 pb	0,417	0,458	280 pb	0,542	0,483	2000 pb	0,417	0,250	1485 pb	0,458	0,833	1400 pb	0,542	0,3751	480 pb	0,375	0,333
1000 pb	0,333	0,500	640 pb	0,375	0,459	650 pb	0,542	0,333		0,528	0,569	1400 pb	0,458	0,500	350 pb	0,292	0,625	1320 pb	0,500	0,708	476 pb	0,583	0,666
950 pb	0,500	0,375	600 pb	0,583	0,459	630 pb	0,500	0,458				1340 pb	0,4584	0,500	340 pb	0,292	0,541	1300 pb	0,542	0,958	450 pb	0,500	0,500
700 pb	0,458	0,583	575 pb	0,542	0,5	600 pb	0,709	0,458				625 pb	0,458	0,208	230 pb	0,417	0,541	1230 pb	0,542	0,541	398 pb	0,500	0,500
650 pb	0,375	0,583	450 pb	0,250	0,375	550 pb	0,458	0,458				600 pb	0,458	0,208	200 pb	0,333	0,541	1200 pb	0,542	0,583	376 pb	0,583	0,416
630 pb	0,458	0,583	420 pb	0,375	0,416	500 pb	0,333	0,458				575 pb	0,333	0,500		0,399	0,571	300 pb	0,375	0,458	350 pb	0,458	0,833
600 pb	0,167	0,583	410 pb	0,417	0,125	495 pb	0,375	0,167				550 pb	0,375	0,375				285 pb	0,417	0,666	302 pb	0,500	0,583
550 pb	0,167	0,583		0,468	0,417	485 pb	0,333	0,208				530 pb	0,375	0,375				280 pb	0,458	0,666	300 pb	0,333	0,541
500 pb	0,250	0,875				455 pb	0,375	0,250				500 pb	0,3751	0,375				245 pb	0,417	0,666	298 pb	0,375	0,541
400 pb	0,250	0,750				415 pb	0,412	0,417				385 pb	0,2085	0,541				240 pb	0,625	0,7916	288 pb	0,666	0,458
370 pb	0,250	0,792				400 pb	0,333	0,5				370 pb	0,416	0,625				225 pb	0,375	0,500	286 pb	0,583	0,458
350 pb	0,083	0,750				385 pb	0,417	0,458				360 pb	0,625	0,625				220 pb	0,375	0,500	284 pb	0,458	0,541
200 pb	0,083	0,750				380 pb	0,417	0,458				350 pb	0,583	0,416				200 pb	0,542	0,500	281 pb	0,375	0,458
	0,303	0,600				290 pb	0,333	0,458				340 pb	0,458	0,458				185 pb	0,542	0,500	280 pb	0,625	0,250
						285 pb	0,292	0,375					0,417	0,403				180 pb	0,500	0,541	260 pb	0,874	0,791
						282 pb	0,0833	0,375										165 pb	0,583	0,541	251 pb	0,500	0,4584
						280 pb	0,333	0,458										163 pb	0,500	0,291	250 pb	0,500	0,458
						240 pb	0,583	0,458										160 pb	0,708	0,666	230 pb	0,583	0,749
						223 pb	0,625	0,208										152 pb	0,625	0,625	224 pb	0,458	0,625
						220 pb	0,625	0,250										148 pb	0,583	0,666	220 pb	0,458	0,5417
						210 pb	0,292	0,5										145 pb	0,417	0,625	181 pb	0,333	0,7499
						200 pb	0,667	0,5										140 pb	0,542	0,916	180 pb	0,333	0,749
						196 pb	0,583	0,458											0,523	0,609		0,501	0,550
						190 pb	0,292	0,458															
						184 pb	0,333	0,208															
						180 pb	0,417	0,250															
							0,423	0,394															

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em razão do desenvolvimento tecnológico do setor sucroalcooleiro, uma grande demanda de novas variedades de cana-de-açúcar mais produtivas agregando características específicas é exigida e o melhoramento genético vegetal tem proporcionado razoavelmente a oferta destes materiais. No entanto, ainda persistem entraves relacionados com o monitoramento e seleção de progênies portadoras destes caracteres alvos de interesse e o longo tempo demandado para a obtenção de novas variedades.

As estratégias moleculares estão sendo amplamente desenvolvidas e um grande número de marcadores genéticos está sendo produzido e disponibilizado para a aplicação em programas de melhoramento genético. Esta nova tendência procura superar a dificuldade de selecionar progênies de alto potencial produtivo em curto espaço de tempo, fundamentando o conceito do Melhoramento Assistido por Marcadores Moleculares (MAS- *Marker Assisted Selection*). Os marcadores moleculares podem explorar regiões aleatórias ou alvos. Os que assumem maior importância ao melhoramento são aqueles que discriminam as regiões transcritas, e preferencialmente amplicon específico, deste modo pode co-segregar com o fenótipo, possibilitando o estudo do genótipo associado ao fenótipo.

Marcadores moleculares do tipo ESTs-SSRs são bons discriminantes destes amplicons, porém a estruturação desta estratégia é dependente de amplo conhecimento de ferramentas para a prospecção destas sequências em bancos de dados e de como acontece o controle da expressão ou via de biossíntese de metabólitos que codificam para a expressão do fenótipo desejado.

Apesar dos estudos genotípicos em cana-de-açúcar serem recentes, alguns aspectos como a grande complexidade do genoma derivada da poliploidia com euploidias, e aneuploidias, presença de cromossomos recombinantes, duplicações cromossômicas e segregação meiótica polissômica tornarem a análise e obtenção destes marcadores mais difícil que em outras espécies. Há a necessidade de reunir informações quanto ao número de amplicons que pode ser encontrado, pois existe variabilidade genética em alelos dos cromossomos hom(e)ólogos. Cada amplicon específico, assim como a dosagem gênica pode contribuir diferencialmente com o valor fenotípico.

Deste modo, os resultados obtidos neste trabalho são de relevante importância para o melhoramento genético, uma vez que indicam quais são os locos que afetam os fenótipos para teores de sacarose ou fibras, aumentando a previsão do comportamento de progênies e diminuindo o tempo de obtenção de novas cultivares destinadas à indústria sucroalcooleira. Plantas com melhor qualidade e produtividade incentivarão as iniciativas voltadas ao setor sucroalcooleiro. Além disso, estas informações poderão servir de base para auxiliar a elucidação do complexo genoma de cana-de-açúcar.