UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Centro de Desenvolvimento Tecnológico
Curso de Graduação em Biotecnologia

Trabalho de Conclusão de Curso

Caracterização fenotípica e molecular de genótipos de cana-de-açúcar

Luize Silva Mascarenhas

Pelotas, 2018

Luize Silva Mascarenhas

Caracterização fenotípica e molecular de genótipos de cana-de-açúcar

Trabalho acadêmico apresentado ao Curso de Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientadora: Luciana Bicca Dode

Pelotas, 2018

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas Catalogação na Publicação

M395c Mascarenhas, Luize Silva

Caracterização fenotípica e molecular de genótipos de cana-de-açúcar / Luize Silva Mascarenhas ; Luciana Bicca Dode, orientadora. — Pelotas, 2018.

45 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Biotecnologia) — Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, 2018.

1. Saccharum spp. 2. Déficit hídrico. 3. Marcador molecular. I. Dode, Luciana Bicca, orient. II. Título.

CDD : 633.61

Elaborada por Ubirajara Buddin Cruz CRB: 10/901

Luize Silva Mascarenhas

Caracterização fenotípica e molecular de genótipos de cana-de-açúcar

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado, como requisito parcial, para obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 29/11/2018

Banca examinadora:

.....
Profª. Drª. Luciana Bicca Dode (Orientadora)
Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

.....
Profª. Drª. Camila Pegoraro
Doutora em Agronomia pela Universidade Federal de Pelotas

.....
Profª. Drª Vanessa Galli
Doutora em Biologia Celular e Molecular pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

.....
Profª. Drª Claudia Fernanda Lemons e Silva
Doutora em Fitotecnia pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

.....
Dr. William Rodrigues Antunes
Doutor em Agronomia pela Universidade Federal de Pelotas.

A minha família e todos aqueles que
fizeram parte desta caminhada.

DEDICO

Agradecimentos

A minha família pelo carinho e por todo apoio durante todas as fases da minha vida, em especial a minha mãe, pelo exemplo de mulher, mãe e profissional. Aos meus avós, Zeila e Francisco, pelo amor e apoio incondicional, por serem incansáveis e sempre minha segunda casa.

A minha orientadora Luciana Bicca Dode, pelo incentivo, por todas as oportunidades que me permitiram ir muito além de concluir este trabalho, pela confiança, amizade, pelo “espírito de mãe” e todos os ensinamentos que vão além dos muros da Universidade.

Ao meu orientador Sérgio Delmar dos Anjos e Silva, pela amizade, pela confiança, pelas oportunidades concedidas, e por fazer com que eu me sentisse em casa desde o primeiro dia.

A Embrapa Clima Temperado pela oportunidade.

Ao Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Clima Temperado, a Natércia e a Raquel pela companhia e auxílio nas análises.

A Cândida por todos ensinamentos, pela amizade, pelos momentos de descontração, por todo auxílio durante o período como IC e estagiária.

Ao Lucas e ao Adílson, por todo incentivo, carinho e paciência, principalmente durante a reta final deste trabalho.

Aos colegas da Agroenergia, pela amizade e pelas memórias compartilhadas.

Aos amigos e colegas, Alejandra, Aury, Carolina, Caroline e Lurian, pela amizade, pelos momentos incríveis compartilhados durante a graduação, por tornarem os últimos anos bem mais fáceis de serem vividos.

A minha eterna dupla Lili, por todos os momentos que compartilhamos durante esses anos, pela cumplicidade do primeiro ao último dia, entre as alegrias, vitórias e frustrações, me alegra lembrar que começamos juntas essa caminhada e terminaremos da mesma forma.

As minhas amigas, Alice, Hanelore, Rafaela e Victoria, que apesar da distância sempre se fizeram presentes, por todo carinho e incentivo de sempre.

A todos que de alguma forma contribuíram para o meu amadurecimento pessoal e profissional, e fizeram parte dessa caminhada, meus mais sinceros agradecimentos.

Muito obrigada!

Resumo

MASCARENHAS, Luize Silva. **Caracterização fenotípica e molecular de genótipos de cana-de-açúcar**. 2018. 45f. Trabalho de Conclusão de Curso — Curso de Bacharelado em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas.

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) é uma das culturas de maior importância agroindustrial no cenário nacional, o que está vinculado principalmente a sua múltipla forma de uso e elevado potencial produtivo. Esta cultura é afetada negativamente pelo déficit hídrico, condição que ocorre em algumas regiões. O objetivo do presente trabalho foi avaliar e caracterizar genótipos de cana-de-açúcar, através de caracteres fenotípicos e moleculares. O experimento foi conduzido na estação experimental da Embrapa Clima Temperado, onde foram avaliados 28 genótipos de cana-de-açúcar, previamente classificados quanto a tolerância ao déficit hídrico. Foram avaliadas características biométricas e visuais, os caracteres biométricos avaliados foram: número de perfilhos ou colmos por metro linear (NCM), estatura de colmos (ALT), diâmetro de colmos (DIA), massa média de um colmo (MMC), tonelada de colmos por hectare (TCH), teor de sólidos solúveis totais do caldo (SST) e tonelada de brix por hectare (TBH). Paralelamente, no Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Clima Temperado, foi extraído DNA de tecidos vegetais de 30 genótipos de cana-de-açúcar. O DNA utilizado para as amplificações de SSR-PCR, foi extraído pelo método CTAB, e foram testados 8 *primers* SSR. Os produtos da PCR foram separados em gel de agarose 3% e posteriormente foi realizada a análise de similaridade com auxílio do programa NTSYS PC 2.10m. Não houve relação entre os resultados fenotípicos e moleculares, para as variáveis avaliadas. Entretanto, a análise molecular permitiu distinguir os genótipos, que demonstraram importante variabilidade genética. Dessa forma, é possível concluir que há variabilidade fenotípica e molecular entre os genótipos avaliados.

Palavras-chave*:* *Saccharum* spp; déficit hídrico; marcador molecular.

Abstract

MASCARENHAS, Luize Silva. **Phenotypic and molecular characterization of sugarcane genotypes.** 2018. 45f. Trabalho de Conclusão de Curso — Curso de Bacharelado em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas.

Sugarcane (Saccharum spp.) is one of the most important agroindustrial crops in the national scenario, which is mainly linked to its many forms of use and high productive potential. This crop is negatively affected by the water deficit, a condition that occurs in some regions. The aim of this work was to evaluate and characterize sugarcane genotypes, through phenotypic and molecular characteristics, aiming water deficit tolerance. The experiment was conducted at the Embrapa Clima Temperado experimental station, where 28 sugarcane genotypes were evaluated, previously classified according to their tolerance to water deficit. Biometric and visual characteristics evaluated were: number of tillers or culms per linear meter (NCM), culm height (ALT), culm diameter (DIA), specific culm mass (MMC), tons of culm per hectare (TCH), juice total soluble solids (SST) and tons of brix per hectare (TBH). At the same time, in the Laboratory of Molecular Biology of Embrapa Clima Temperado, DNA was extracted from the plant tissue of 30 sugarcane genotypes. The DNA used in microsatellite (SSR) amplification by PCR was extracted using the CTAB method, and 8 SSR primers were tested. PCR products were separated in 3% agarose gel and later a similarity analysis was performed with the aid of the software NTSYS PC 2.10m. No relation was found among the phenotypic and molecular results, for the evaluated variables. However, the molecular analysis allowed to distinguish the genotypes, which presented important genetic variation. This way, it's possible to conclude that there is phenotypic and molecular variation between the evaluated genotypes.

Keywords: Saccharum spp; water deficit; molecular marker.

Lista de Figuras

Figura 1- Produção e área plantada de cana-de-açúcar no mundo entre os anos 1994 a 2016. 15
Figura 2- Evolução da produtividade de cana-de-açúcar no Brasil. 16
Figura 3- Partes de uma gramínea genérica. 18
Figura 4- Estádios de desenvolvimento da cana-de-açúcar. 20
Figura 5- Fluxograma resumido das etapas de seleção dos genótipos e origem do experimento de campo. Testes realizados nos anos de 2016 e 2017 desenvolvidos por Härter (2018) e caracterização fenotípica e molecular realizada em 2018, em continuidade aos experimentos anteriores 27
Figura 6- População em fase avançada de seleção para tolerância ao déficit hídrico. Genótipos avaliados para caracterização fenotípica e molecular em Pelotas, RS, março de 2018. 28
Figura 7- Dendrograma de 28 genótipos de cana-de-açúcar obtido a partir da análise de dissimilaridade pela distância Euclidiana Média, utilizando o método de agrupamento de ligação média entre grupo (UPGMA). 35
Figura 8- Perfil de bandas obtido com o par de primers SOMS148, para as 30 amostras de DNA avaliadas, onde a letra M indica o marcador 1kb plus.....37
Figura 9- Perfil de bandas obtido com o par de primers UGSM585, para as 30 amostras de DNA avaliadas, onde a letra M indica o marcador 1kb plus.....37
Figura 10- Perfil de bandas obtido com o par de primers SCC06, para as 30 amostras de DNA avaliadas, onde a letra M indica o marcador 1kb plus.....38
Figura 11- Dendrograma de 30 genótipos de cana-de-açúcar obtido a partir da análise de microssatélite utilizando o índice de similaridade de DICE e o método de agrupamento de ligação média entre grupo (UPGMA). 38

Lista de Tabelas

Tabela 1. Produção em toneladas, dos dez maiores produtores de cana-de-açúcar do mundo, média da produção entre os anos de 1994 a 2016. 14

Tabela 2. Relação dos genótipos avaliados, origem das famílias e nível de tolerância.....29

Tabela 3- Relação dos genótipos caracterizados molecularmente, identificação das amostras, origem das famílias e nível de tolerância.....31

Tabela 4. Relação de primers utilizados para caracterização molecular de genótipos de cana-de-açúcar. 32

Tabela 5. Valores médios de toneladas de colmo por hectare (TCH) e toneladas de brix por hectare (TBH), sólidos solúveis totais (SST), altura de planta (ALT), diâmetro do colmo (DIA), massa média do colmo (MMC), número de colmos por metro linear (NCM) para 28 genótipos de cana-de-açúcar. 34

Tabela 6. Valores médios de sólidos solúveis totais (SST), altura de planta (ALT), diâmetro do colmo (DIA), massa média do colmo (MMC); número de colmos por metro linear (NCM), reação a Ferrugem (FER), nota geral (NG), toneladas de colmo por hectare (TCH) e toneladas de brix por hectare (TBH) para o agrupamento via análise de dissimilaridade pela distância Euclidiana Média entre 28 genótipos de cana-de-açúcar. 36

Sumário

1. Introdução 11
2. Objetivos 13
2.1. Objetivo Geral 13
2.2. Objetivos específicos 13
3. Revisão de Literatura 14
3.1. Cana-de-açúcar 14
3.1.1 Cenário Mundial 14
3.1.2 Importância Socioeconômica 16
3.1.3 Classificação taxonômica 17
3.1.4 Morfologia 17
3.2 Estresse abiótico 20
3.2.1 Déficit Hídrico 21
3.3 Marcadores Moleculares 22
4. Metodologia 27
4.1. Caracterização fenotípica de genótipos de cana-de-açúcar 28
4.2. Caracterização molecular de genótipos de cana-de-açúcar 30
5. Resultados e Discussão 33
5.1. Caracterização fenotípica de genótipos de cana-de-açúcar 33
5.2. Caracterização molecular de genótipos de cana-de-açúcar 37
6. Considerações finais 40
7. Referências Bibliográficas 41

1. Introdução

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) é uma espécie tropical, que apresenta múltiplas formas de utilização, tanto na agricultura quanto na indústria, além de elevado potencial produtivo, tornando-a uma das culturas de maior importância agroindustrial no cenário nacional. O Brasil atualmente é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, apresentando uma área cultivada de 8,7 milhões hectares e produtividade média de 72,5 t/ha^{-1} na safra 2017/18 (CONAB, 2018).

A importância da cultura está associada principalmente a ampla utilidade, que possibilita gerar grande quantidade de produtos. Além da produção de álcool e açúcar, pode ser utilizada como fonte de alimento para animais e no processamento de produtos agroindústrias como rapadura, melado, açúcar mascavo e aguardente.

A cultura é fortemente influenciada pelas variações meteorológicas ao longo de todo seu ciclo vegetativo e durante o período de maturação, visto que os principais fatores ambientais que influenciam a produtividade são a temperatura do ar, disponibilidade hídrica e radiação solar (VIANNA; SENTELHAS, 2014).

A baixa disponibilidade hídrica afeta negativamente o crescimento e desenvolvimento das plantas, afetando o desempenho produtivo das mesmas, sendo apontada como a principal causa da redução da produtividade dos cultivos agrícolas. A dimensão do impacto causado pelo déficit hídrico na produtividade agrícola ocorre conforme a fase de desenvolvimento da planta (RESENDE et al., (2008).

A cana-de-açúcar apresenta exigências quanto às condições meteorológicas durante algumas fases do seu desenvolvimento, tendo sua produtividade influenciada por fatores climáticos. Nos últimos anos, houve um aumento considerável em estudos acerca da tolerância varietal em relação aos estresses abióticos, envolvendo fatores climáticos, visto que a espécie é considerada altamente dependente das condições meteorológicas para a sua produção (ANTUNES, 2015).

Nesse sentido, considerando o que foi exposto, pode-se verificar a importância da utilização de genótipos com elevada adaptabilidade as condições edafoclimáticas. Dessa forma, considerando a variabilidade genética existente em cana-de-açúcar quanto à tolerância ao déficit hídrico (SALIENDRA et al., 1996;

INMAN-BANBER & SMITH, 2005), fica evidente a importância da identificação de genótipos superiores para esta característica.

Os avanços da biotecnologia desde a década de 70, permitiram o desenvolvimento e aperfeiçoamento de técnicas moleculares, que associadas às áreas de bioinformática e genética quantitativa, apresentam-se como alternativa para auxiliar em processos de melhoramento genético (LANZA et al., 2000).

A utilização de técnicas de biologia molecular, como o uso de marcadores moleculares, é uma alternativa de interesse para o melhoramento genético aplicado, tornando-se benéfica, a partir da utilização direta de informações de DNA nos programas de seleção. Esta técnica permite alta eficiência seletiva, rapidez na obtenção de ganhos genéticos e baixo custo quando comparado com métodos tradicionais de seleção (RESENDE et al., 2008). Diversos estudos apontam a utilização de marcadores moleculares no melhoramento genético da cana-de-açúcar, contribuindo para elucidação do complexo genoma da espécie, auxiliando na escolha de genitores, na identificação de genótipos superiores e também na construção de mapas genéticos (PINTO, 2008).

Nesse sentido, o presente trabalho tem como objetivo realizar a caracterização fenotípica e molecular de genótipos de cana-de-açúcar.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Caracterizar fenotípica e molecularmente genótipos de cana-de-açúcar previamente selecionados em testes para tolerância ao déficit hídrico.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar características biométricas em genótipos de cana-de-açúcar;
- Avaliar o desempenho agronômico de genótipos de cana-de-açúcar;
- Caracterizar molecularmente genótipos de cana-de-açúcar através de sequências microssatélites.

3. Revisão de Literatura

3.1. Cana-de-açúcar

3.1.1 Cenário Mundial

A cana-de-açúcar é uma das principais culturas de importância econômica no mundo, sendo cultivada em mais de 100 países. No entanto, aproximadamente 80% da produção mundial está concentrada em dez países, segundo dados da FAO (2018), apresentados na tabela 1. O Brasil ocupa a primeira posição no ranking dos maiores produtores de cana-de-açúcar no mundo, considerando a média realizada entre os anos de 1994 e 2016.

Tabela 1. Produção em toneladas, dos dez maiores produtores de cana-de-açúcar do mundo, média da produção entre os anos de 1994 a 2016.

Países	Produção em toneladas
Brasil	510.971.291,70
Índia	303.231.206,60
China	96.691.484,35
Tailândia	67.389.225,83
Paquistão	52.864.769,13
México	49.567.041,87
Colômbia	35.408.226,83
Austrália	33.840.057,96
EUA	29.383.377,48
Indonésia	26.872.318,26

Fonte: FAO, 2018.

A produção mundial de cana-de-açúcar, bem como a área plantada, tiveram um incremento significativo a partir do ano de 2005 (Figura 1), estabilizando esse crescimento no ano de 2013, ano em que atingiu o maior valor em produção de toneladas.

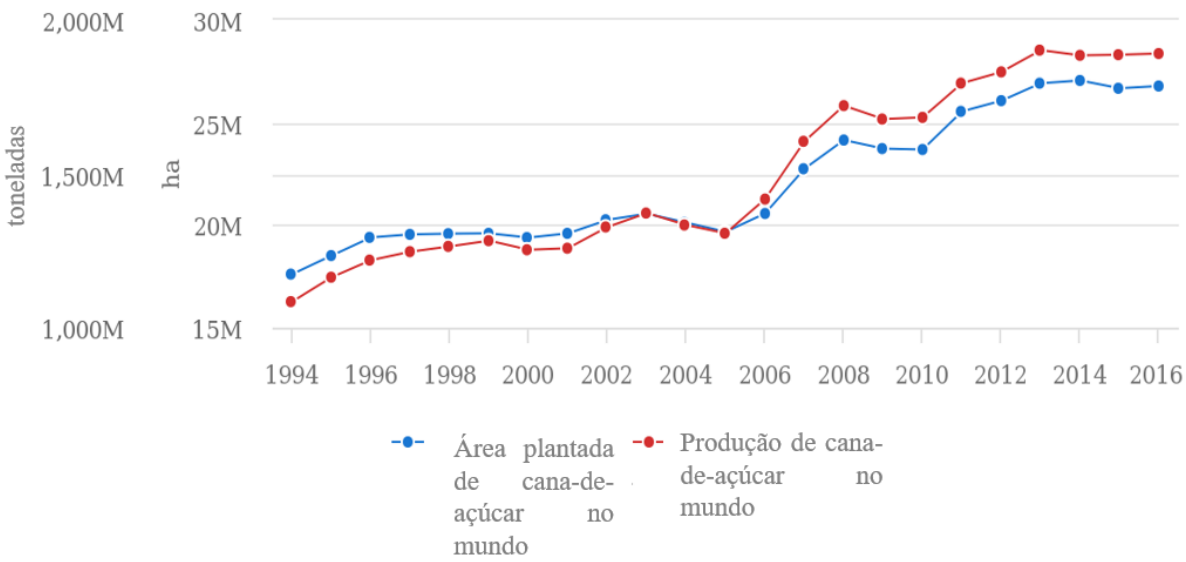

Figura 1- Produção e área plantada de cana-de-açúcar no mundo entre os anos 1994 a 2016.
Fonte: FAO, 2018.

Segundo levantamento feito pela Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2018), no Brasil, a produção de cana-de-açúcar estimada para a safra 2018/19, é de 635,51 milhões de toneladas; a área colhida está estimada em 8,66 milhões de hectares; e a produtividade média estimada para a safra 2018/19 é de 73,3t/ha^{-1}. A produção de açúcar deve atingir 34,2 milhões de toneladas; quanto ao etanol, estima-se a produção de 30,41 bilhões de litros.

Conforme ilustrado na figura 2, a expectativa é de um leve aumento na produtividade em relação à safra anterior. Nota-se que a produtividade nos últimos anos tem sido menor do que nas safras anteriores, isso pode estar associado ao envelhecimento das lavouras, a baixa taxa de renovação, a falta de investimento em algumas regiões, e a redução do pacote tecnológico. A introdução da colheita mecanizada também influenciou na redução da produtividade nos últimos anos em lavouras que não estavam sistematizadas para esse tipo de prática cultural, ocasionando compactação do solo nas entrelinhas e danificação das soqueiras (CONAB, 2018).

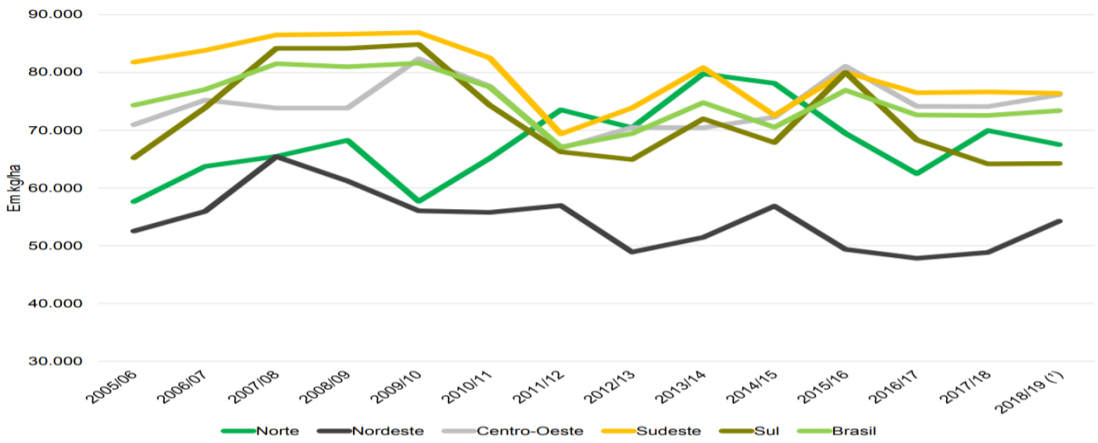

Figura 2- Evolução da produtividade de cana-de-açúcar no Brasil.
Fonte: Conab, 2018.

3.1.2 Importância Socioeconômica

Como exposto no tópico anterior, o Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, que é a matéria-prima da fabricação do açúcar e do etanol no Brasil. Em relação aos combustíveis renováveis, atualmente o etanol é o biocombustível de maior expressão. Por ser menos poluente que os combustíveis derivados do petróleo, bem como de outros biocombustíveis como o biodiesel, por exemplo, assume grande importância no contexto do compromisso da sociedade em encontrar fontes alternativas aos combustíveis fósseis (BACCHI, 2007).

A cultura da cana-de-açúcar também tem alto impacto sobre o desenvolvimento econômico das regiões onde é cultivada. Uma série de estudos tem demonstrado que municípios com usinas ou com produção expressiva de cana-de-açúcar, apresentam uma renda *per capita e PIB* maior se comparados a municípios que não produzem este tipo de cultura (WALTER et al., 2008; SPAVOREK et al., 2009; CHAGAS; TONETO; AZZONI, 2011).

Segundo Bacchi e Caldarelli (2015), a expansão do setor sucroenergético, no estado de São Paulo, tem efeitos positivos sobre o emprego e a renda, em razão da presença de usinas e destilarias no estado. Sendo assim, tanto a produção de açúcar, como a de etanol, que utilizam como matéria prima a cana-de-açúcar, influenciam na geração de renda e empregos, impactando positivamente a população que vive nas proximidades das regiões produtoras.

No Rio Grande do Sul (RS), a cana-de-açúcar teve seu cultivo introduzido em 1725, no entanto a produção da cultura representa menos de 0,5% da área plantada no Brasil. Apesar da produção da cana-de-açúcar no RS não apresentar expressão

relevante no cenário nacional, seu cultivo apresenta grande importância, por estar associado à agricultura familiar. Atualmente a cultura está presente em 31.215 estabelecimentos agropecuários (IBGE, 2017), sendo utilizada para o processamento artesanal de subprodutos, como aguardente, melado e açúcar mascavo, bem como na alimentação animal, em épocas de baixa oferta de forragem.

3.1.3 Classificação taxonômica

A cana-de-açúcar é uma espécie pertencente à família Poaceae e ao gênero *Saccharum*, classificada como uma planta alógama e semi-perene, tem como origem a região sudeste da Ásia, com destaque para Nova Guiné, China e Índia (DIOLA; SANTOS, 2012). O gênero *Saccharum* compreende pelo menos seis espécies, sendo elas: *S. officinarum* L. (2n = 80), *S. robustum* Brandes e Jeswietex Grassl (2n = 60-205), *S. barberi* Jeswiet (2n = 81-124), *S. sinense* Roxb (2n = 111-120), *S. spontaneum* L. (2n = 40-128) e *S. edule* Hassk. (2n = 60-80) (MATSUOKA et al., 2005). As espécies pertencentes a este gênero são caracterizadas por serem altamente heterozigóticas, apresentando elevados níveis de poliploidia e frequente ocorrência de aneuploidia.

Atualmente, as variedades cultivadas de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) são híbridos interespecíficos oriundos do cruzamento das espécies *Saccharum spontaneum* e *S. officinarum.* Com exceção a *S. edule*, o genoma de todas as espécies do gênero *Saccharum* podem contribuir parcialmente para o genoma dos híbridos cultivados (MATSUOKA et al., 2005).

3.1.4 Morfologia

A cana-de-açúcar é uma gramínea de clima tropical, que desenvolve-se na forma de touceiras, constituídas pela parte aérea, formada por colmos, folhas e inflorescências, e por uma parte subterrânea, constituída por raízes e rizomas. Devido a estrutura tipo rizoma sob o rés do chão, a cana rebrota sempre que a parte aérea for cortada, sendo a nova brotação conhecida como soqueira (ANTUNES, 2015).

O sistema radicular da espécie é formado por raízes adventícias e permanentes, formando um sistema fasciculado, podendo chegar até quatro metros

de profundidade. O colmo, ou seja, o caule é responsável pela sustentação das folhas e inflorescência, é composto por nódios (ou nós) e internódios (ou entrenós) e pode apresentar os portes: ereto, semiereto ou decumbente (CESNIK; MIOCQUE, 2004). A morfologia do colmo é bastante variável, podendo apresentar diferenças quanto ao diâmetro, longitude dos entrenós, formato e cor, conforme a variedade. O nó engloba a gema, o anel de crescimento, a cicatriz foliar e a zona radicular. É uma região importante para a descrição das variedades, pois apresenta muita variação.

As folhas da cana-de-açúcar são alternadas, fixadas à base do colmo nos nós e divididas em três partes: bainha, lâmina foliar e colar (figura 3). A bainha é em formato tubular, envolvendo o colmo e ligando a lâmina foliar ao nódio no colmo. Já a lâmina foliar é a região que se projeta a partir da bainha, sustentada pela nervura central, alongada e plana. A lâmina foliar pode se manter ereta, dobrada ou curva. A bainha pode apresentar coloração diferente da lâmina foliar, além da presença de pêlos e cera, sendo isso variável com o genótipo. O ponto de ligação entre a bainha e a lâmina foliar é denominado de colar, que ainda é dividido em cotovelo, lígula e aurícula (FERRARI, 2010).

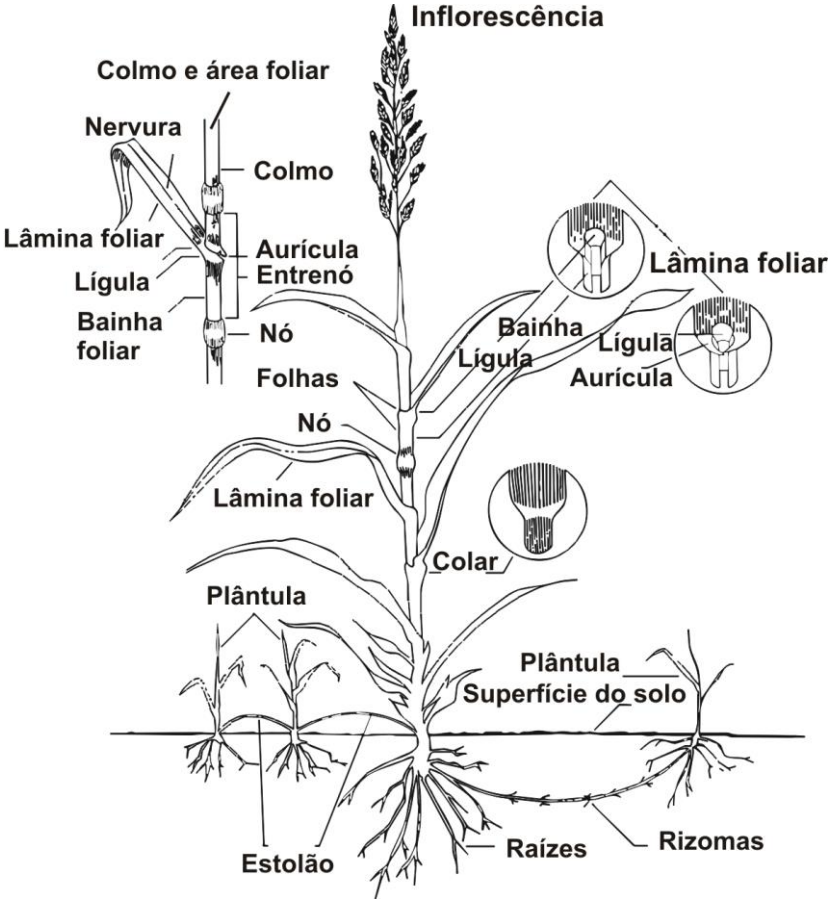

Figura 3- Partes de uma gramínea genérica.
Fonte: Ball et al. (2007).

A inflorescência da cana-de-açúcar é do tipo panícula aberta, forma sagitada, as flores são muito pequenas. Uma única panícula contém centenas a milhares de flores, sendo que um colmo pode gerar uma única panícula. As flores são hermafroditas, pode ocorrer autofecundação, embora rara. O androceu é constituído por três estames, portando uma antera cada um (VAN DILLEWIJN, 1952, apud FERRARI, 2010).

Os estádios fenológicos da cana-de-açúcar estão ilustrados na figura 4, são eles: brotação e emergência; perfilhamento; crescimento dos colmos; maturação dos colmos. No estádio de brotação e emergência, o broto rompe as folhas da gema e se desenvolve em direção à superfície do solo, ao passo que surgem as raízes do tolete. A emergência do broto ocorre de 20 a 30 dias após o plantio. No estádio do perfilhamento, ocorre a emissão de colmos de uma mesma planta, os quais recebem a denominação de perfilhos. Os brotos aparecem de 20 a 30 dias após a emergência do colmo primário, o perfilhamento é responsável pela formação da touceira da cana-de-açúcar e a população de colmos que será colhida. O estádio de crescimento dos colmos, ocorre a partir do auge do perfilhamento, então, os colmos sobreviventes dão continuidade ao crescimento e desenvolvimento, ganhando altura e iniciando o acúmulo de açúcar na base. Por fim, no estádio de maturação dos colmos, quando as touceiras atingem altura igual ou superior a dois metros, nota-se o amarelecimento e a consequente seca das folhas que se encontram na altura mediana da planta, indicando que já está sendo depositado açúcar nessa região. No período entre o outono e o inverno, existe uma maior atividade de maturação e menor atividade de crescimento, sendo nesse período em que ocorre o mais intenso armazenamento de açúcar (GASCHO; SHIH, 1983).

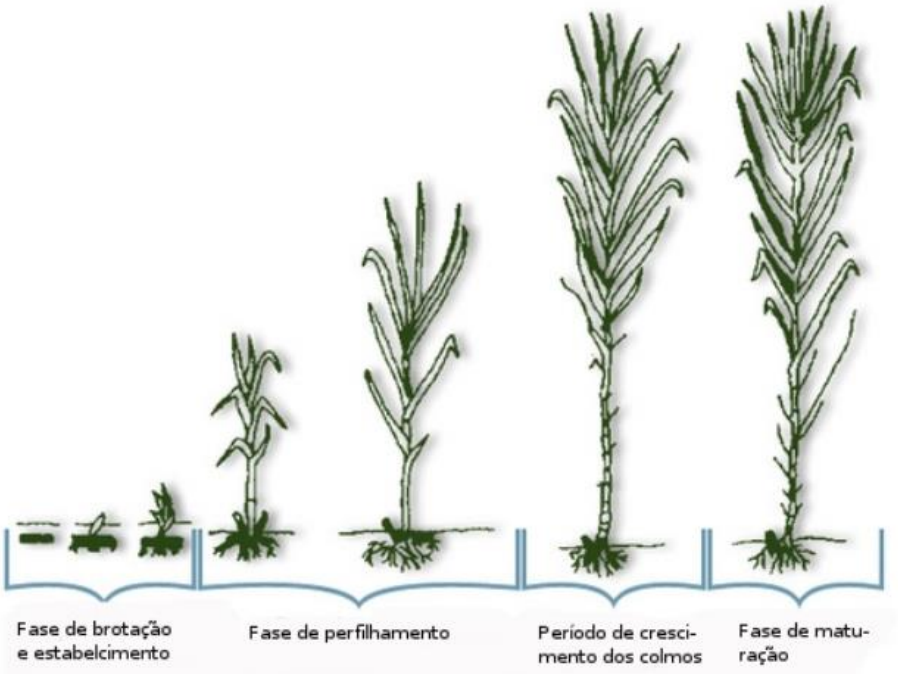

Figura 4- Estádios de desenvolvimento da cana-de-açúcar.
Fonte: Gascho; Shih (1983).

3.1.5 Genoma da espécie e atividades de melhoramento genético

Apesar dos investimentos e avanços no melhoramento genético da cana-de-açúcar, a compreensão do genoma da espécie ainda é limitada. Segundo D'Hont et al., (1996), a cultura apresenta um dos genomas mais complexos do reino vegetal, com um número diploide de cromossomos que varia entre 70-120. Diferentemente do encontrado em outras espécies, como arroz, milho e soja, que já possuem seus genomas completamente sequenciados, montados e anotados, para cana-de-açúcar ocorre dificuldade na montagem e não existe um genoma de referência, devido à complexidade genômica da espécie.

Em decorrência dos avanços da biotecnologia na área genômica, atualmente estão disponíveis diversas ferramentas como, bibliotecas de BACs (Bacterial Artificial Chromosome), coleções de EST (Expressed Sequence Tag), bem como mapas genéticos e sequências expressas obtidas a partir da técnica de RNA-Seq.

3.2 Estresse abiótico

Entre os principais fatores ambientais que afetam o crescimento vegetal, podem ser citados, luz, água, temperatura, disponibilidade de nutrientes no solo e

toxinas (metais pesados e salinidade). As alterações desses fatores, além dos limites normais, em geral têm consequências bioquímicas e fisiológicas negativas para as plantas (TAIZ; ZEIGER; MOLLER; MURPHY, 2017). Os estresses ambientais são fatores limitantes para o desenvolvimento de diversas espécies, reduzindo a produtividade e limitando a expansão das culturas para novas áreas.

Entre os grupos de intermediários tóxicos produzidos por estresse, o mais comum é o das espécies reativas de oxigênio (EROs). Quando ocorre a presença de EROs em grande quantidade, e na ausência de um mecanismo de proteção, essas podem alterar o metabolismo das células, causar danos nos cloroplastos, inibir as reações fotoquímicas, diminuir a fotossíntese e causar a perda da integridade da membrana celular (VIGHI, 2016).

As plantas produzem alterações metabólicas, fisiológicas e anatômicas para contrapor os efeitos do estresse abiótico. Esses mecanismos compreendem a capacidade de acumular metabólitos e proteínas de proteção, regular crescimento, morfogênese, fotossíntese, transporte através da membrana, aberturas estomáticas e alocação de recursos (TAIZ; ZEIGER; MOLLER; MURPHY, 2017).

3.2.1 Déficit Hídrico

O déficit hídrico em plantas afeta o crescimento e o desenvolvimento das culturas em todo o mundo, podendo ocasionar prejuízos no crescimento e desenvolvimento de plantas, sendo uma das principais causas de baixas produtividades (LECOEUR; SINCLAIR, 1996). Assim como na maioria dos organismos, a água representa a maior parte do volume celular das plantas, sendo também o recurso mais limitante para o crescimento vegetal. O déficit hídrico pode afetar diferentemente as plantas, ocasionando desidratação celular, a qual afeta negativamente muitos processos fisiológicos e bioquímicos.

Existe um conflito entre a manutenção da água pela planta e a taxa de assimilação de CO_2 para produção de carboidratos, visto que a abertura dos estômatos é necessária para a admissão de CO_2, por outro lado, a abertura dos mesmos favorece a perda de água para o ambiente (TAIZ; ZEIGER, 1991). A necessidade da planta em resolver esse conflito, faz com que a planta desenvolva mecanismos morfofisiológicos, que as conduzem a economizar água para uso em períodos posteriores (MCCREE; FERNÁNDEZ, 1989). A deficiência hídrica provoca

alterações na planta, onde o grau dessas alterações é decorrente da intensidade do estresse e do genótipo (SMIT & SINGELS, 2006), e a irreversibilidade depende do genótipo, da duração do período de estresse, da severidade do estresse e do estádio de desenvolvimento da planta no período de estresse hídrico (SANTOS; CARLESSO, 1998). Segundo Ortolani e Camargo (1987) sem se considerar os efeitos extremos, o déficit hídrico é responsável por 60 a 70% da variabilidade final da produção agrícola mundial. Portanto, o desenvolvimento de tecnologias capazes de minimizar os danos por déficit hídrico é fundamental para a garantia de safras mais estáveis e previsíveis, seja pelo incentivo à irrigação em áreas que isso seja permissivo, seja com o desenvolvimento de genótipos mais tolerantes a condições de estresse hídrico.

A produtividade da cana-de-açúcar é influenciada por variações climáticas ao longo do seu ciclo. A espécie apresenta algumas exigências quanto às condições meteorológicas na fase de brotação, perfilhamento e crescimento (BRUNINI, 2008). Segundo Almeida et al. (2008), a necessidade hídrica da cana-de-açúcar altera-se de acordo com o período de sua fase vegetativa de desenvolvimento. O déficit hídrico na espécie pode reduzir em até 60,0% a produtividade de colmos e de açúcar (BASNAYAKE et al., 2015).

A região Sul do Brasil é caracterizada por uma diferenciação climática bem definida entre as estações do ano, apresentando como principais estresses ambientais a ocorrência de geadas durante o inverno e estiagem no verão. Dessa forma, o período de maior demanda hídrica da cana-de-açúcar corresponde ao período de estiagem, afetando o desenvolvimento da cultura e consequentemente reduzindo a produtividade final (HÄRTER, 2018).

3.3 Marcadores Moleculares

Conforme descrito por Bered et al. (1997), marcadores genéticos são caracteres com mecanismo de herança simples que podem ser empregados para avaliar diferenças genéticas entre dois ou mais indivíduos, podendo ser divididos em dois grupos: marcadores morfológicos e marcadores moleculares.

Inicialmente, os estudos genéticos e de melhoramento eram realizados utilizando-se marcadores morfológicos, controlados por genes associados a características morfológicas, geralmente fenótipos de fácil identificação visual. Os marcadores morfológicos contribuíram de maneira significativa para o embasamento

teórico da análise de ligação gênica e para os primeiros mapeamentos genéticos (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998; LANZA, et al., 2000).

O crescimento da biotecnologia desde a década 70 levou ao desenvolvimento de diversas técnicas de biologia molecular, e tornou possível a manipulação do DNA, o que permitiu grandes avanços na engenharia genética e também o surgimento dos marcadores moleculares. O desenvolvimento de técnicas moleculares, associado ao avanço nas áreas de bioinformática e da genética quantitativa, tornam-se alternativa para aplicação de técnicas para acelerar e monitorar programas de melhoramento genético, contribuindo para o desenvolvimento de variedades melhoradas.

Segundo Ferreira e Grattapaglia (1998), marcador molecular pode ser definido como todo e qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso ou de um segmento específico de DNA. A utilização de marcadores moleculares torna-se uma ferramenta valiosa para os programas de melhoramento genético, viabilizando a caracterização genética de um grande número de genótipos, através de procedimentos relativamente simples, podendo ser incorporado para a seleção de características de interesse agronômico, nos primeiros estágios do programa de melhoramento. Esses marcadores apresentam diversas vantagens quando comparados aos marcadores morfológicos, por fornecerem um número ilimitado de polimorfismos ao longo do genoma e principalmente por não sofrerem influência ambiental. Além disso, independem do estádio fenológico da planta, permitindo a identificação em estádios iniciais do desenvolvimento (LANZA et al., 2000).

A tecnologia dos marcadores moleculares pode ser aplicada em programas de melhoramento genético de plantas para fins de estudos de diversidade genética, seleção de genitores, identificação e proteção de cultivares, e melhoramento assistido por marcadores moleculares (LANZA et al., 2000).

Em relação à diversidade genética e seleção de genitores, os diferentes tipos de marcadores moleculares disponíveis são capazes de realizar uma amostragem muito ampla do genoma, podendo ser aplicado para fins filogenéticos, evolutivos, programas de melhoramento genético e até mesmo na manutenção de bancos de germoplasma. Com uso dos marcadores, os genótipos são avaliados, comparados e as bandas comuns a todos os indivíduos são interpretadas como semelhanças genéticas, e as não-comuns, como diferenças genéticas. Os resultados são codificados em matrizes de similaridade, e as informações de diversidade genética,

bem como informações adicionais como a associação de determinada característica fenotípica a um dado marcador molecular, pode ser utilizada como um dos critérios para a seleção de genitores em um programa de melhoramento (LANZA et al., 2000).

Segundo Lanza et al. (2000), o uso de marcadores na caracterização e proteção de cultivares, linhagens ou híbridos tem sido de grande importância na proteção do direito intelectual do melhorista, podendo ser usada como prova legal em discussões jurídicas acerca de determinada cultivar/genótipo. Com o uso de um sistema de marcadores moleculares, multialélicos e altamente conservados, como é o caso do SSR (*Simple Sequence Repeats*), é possível identificar um padrão único para cada cultivar, formando uma espécie de impressão digital para aquele genótipo.

Uma das maiores contribuições dos marcadores moleculares foi a possibilidade de realizar a seleção de genótipos assistida por marcadores moleculares; assim, características controladas geneticamente podem ser identificadas antes mesmo das plantas chegarem à fase adulta. É possível identificar a herança genética de determinado cruzamento, verificando se o gene de interesse se encontra na progênie, até mesmo em plântulas, acelerando assim o programa de melhoramento. Segundo Lanza et al. (2000), a utilização de marcadores moleculares em programas de introdução de genes por retrocruzamento é o exemplo mais concreto e de maior uso em programas de melhoramento. Genótipos não-adaptados são utilizados em programas de melhoramento com a finalidade de introduzir características de herança simples, como resistência a doenças. Nesses casos, o uso de marcadores moleculares associados ao loco responsável por esse fenótipo de interesse servem como uma ferramenta para confirmação da transferência do gene e controle da sua manutenção nos cruzamentos futuros.

Outra contribuição significativa que os marcadores moleculares trouxeram aos programas de melhoramento genético é a possibilidade de identificar mais de um gene, mesmo que relacionados a um mesmo fenótipo. Por exemplo, quando o objetivo do programa de melhoramento for a introdução de mais de um gene relacionado à resistência de determinada doença, com vista a conseguir uma resistência mais durável (RIBEIRO do VALE, 2001), a confirmação da transferência de todos os genes seria muito complicada apenas com avaliações fenotípicas. Nesse sentido, o uso de marcadores moleculares diferentes, cada um associado a determinado gene, tornaria o trabalho relativamente simples.

Com o uso de marcadores moleculares é possível realizar o mapeamento genético, relacionando marcadores moleculares específicos com características fenotípicas. No mapeamento genético, são realizados cruzamentos entre genótipos com fenótipos selecionados; conforme a frequência de recombinação entre os marcadores a distância entre eles vai sendo estimada, até que, após sucessivos cruzamentos, se consiga mapear todos os cromossomos do indivíduo (TOLEDO et al., 2008).

Os QTLs (*Quantitative Trait Locus*) são regiões do genoma associadas a fenótipos com distribuição contínua, como por exemplo a altura de determinada planta ou animal; produção de grãos de uma espécie; % de óleo de uma semente. Um QTL, embora seja chamado de locus, não se refere a apenas um gene, mas geralmente um conjunto de genes (MILES; WAYNE, 2008). Com fins de aplicações no melhoramento de plantas, o mapeamento de QTLs se torna importante; no entanto para realizar o mapeamento são necessárias informações como: caráter quantitativo de interesse, dados de marcadores moleculares os quais são associados aos QTLs e a metodologia para associá-los (TOLEDO et al., 2008).

Os marcadores moleculares podem ser divididos em três categorias: **marcadores baseados em hibridização**, sendo o marcador mais conhecido o RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), os **marcadores baseados em sequenciamento**, sendo o principal marcador o SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) e os **marcadores baseados em PCR** (Reação em cadeia da Polimerase- *Polymerase Chain Reaction*), sendo os mais conhecidos dentro desse grupo: RAPD (*Random Amplified Polymorphism DNA*), ISSR (*Inter-simple sequence repeats*), SSR (*Simple Sequence Repeats*), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*). Outra divisão aplicada a esses marcadores é quanto ao tipo de herança alélica, podendo ser classificados em dominantes e codominantes. Os marcadores codominantes possibilitam diferenciar indivíduos homozigotos de heterozigotos; enquanto que com marcadores dominantes isso não é possível, sendo possível apenas determinar a presença ou ausência de determinada característica (TURCHETTO-ZOLET et al., 2017).

Os marcadores do tipo microssatélites (SSR) são de grande importância e aplicabilidade, uma vez que os microssatélites estão dispersos por todo o genoma, são fáceis de serem acessados, multialélicos, é um tipo de marcador co-dominante, e além disso, o polimorfismo exibido por essa técnica é maior do que qualquer outro

sistema de marcadores da atualidade. Essa técnica é baseada na amplificação por PCR de regiões específicas do genoma utilizando um par de iniciadores locus específico (TURCHETTO-ZOLET et al., 2017). Os microssatélites são sequencias de 1 a 6 nucleotídeos que podem estar repetidas em *tandem*. O polimorfismo alélico ocorre em um loco microssatélite devido a mudanças no número de repetições, e é identificado pelo uso de *primers* que flanqueiam essas regiões, sendo os produtos dessas amplificações são visualizados em gel de eletroforese (BUSO et al., 2003).

O emprego de marcadores moleculares em pesquisas com cana-de-açúcar contribuiu para avanços na compreensão do complexo genoma da espécie. Diversos tipos de marcadores estão disponíveis para análise genômica da cana-de-açúcar, no entanto o uso de marcadores do tipo SSR têm se destacado. Marcadores SSR têm sido utilizados em cana-de-açúcar para estudo da variabilidade genética (DUTRA FILHO et al., 2013), mapeamento genético (OLIVEIRA, 2006), seleção de indivíduos e análise de transferência de alelos (CHEN et al., 2009), dentre outras aplicações.

4. Metodologia

No ano de 2018, na Estação Experimental da Embrapa Clima Temperado, foi realizada a caracterização fenotípica e molecular de 25 genótipos de cana-de-açúcar. Os genótipos avaliados são oriundos de cruzamentos realizados na estação de floração e hibridação da Serra do Ouro, em Murici, AL, pertencente à Universidade Federal de Alagoas (UFAL), integrante da RIDESA (Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroenergético), instituição com a qual a Embrapa possui parceria e vínculo de pesquisa.

As avaliações de desempenho agronômico, características biométricas e caracterização molecular, foram realizadas em continuidade ao experimento desenvolvido por Härter (2018), conforme figura 5.

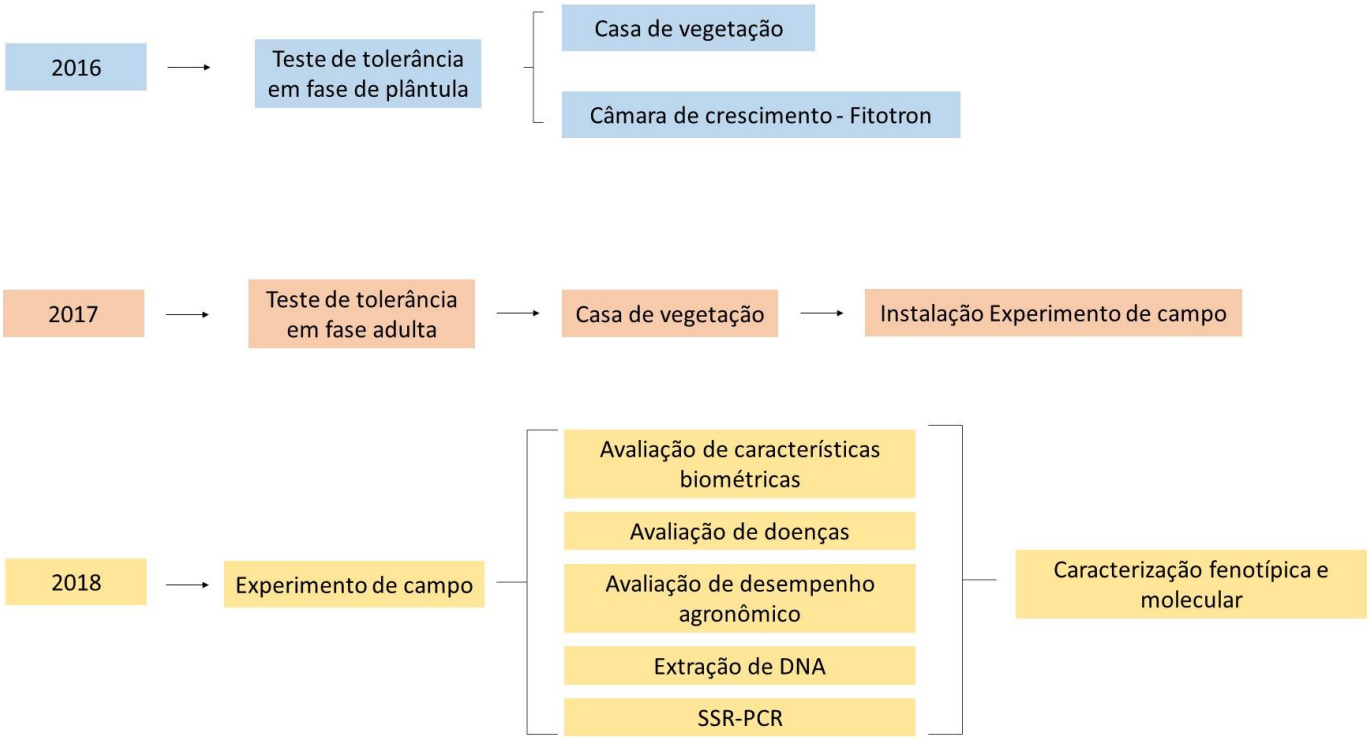

Figura 5- Fluxograma resumido das etapas de seleção dos genótipos e origem do experimento de campo. Testes realizados nos anos de 2016 e 2017 desenvolvidos por Härter (2018) e caracterização fenotípica e molecular realizada em 2018, em continuidade aos experimentos anteriores

4.1. Caracterização fenotípica de genótipos de cana-de-açúcar

Na Estação Experimental da Embrapa Clima Temperado, nos anos de 2016 e 2017, foram conduzidos experimentos para o desenvolvimento de metodologias de seleção avançada em cana-de-açúcar, objetivando a tolerância ao déficit hídrico em progênies de cana-de-açúcar, realizando a simulação de déficit hídrico em ambiente controlado em duas fases de desenvolvimento (fase de plântula e fase adulta), possibilitando a realização de um *screening* das progênies avaliadas, conforme metodologia descrita por Härter (2018). Após esta etapa, foi realizada a multiplicação vegetativa dos genótipos avaliados para implantação de um experimento em nível de campo (Figura 6), avaliando-se o desempenho agronômico e características fenotípicas mensuradas por biometria.

Figura 6- População em fase avançada de seleção para tolerância ao déficit hídrico. Genótipos avaliados para caracterização fenotípica e molecular em Pelotas, RS, março de 2018.
Foto: Adílson Härter.

O experimento de campo foi conduzido na estação experimental da Embrapa Clima Temperado, utilizando-se 25 genótipos pré-selecionados em condição controlada (Tabela 2), adotando-se três variedades como padrões, sendo estas RB867515 variedade de ciclo de maturação médio tardio e tolerante ao déficit hídrico, RB92579 variedade de ciclo de maturação médio tardio e altamente responsiva a irrigação, apresenta boa recuperação após períodos de déficit hídrico, e RB855156 variedade de ciclo de maturação precoce e tolerância de intermediária a sensível em relação a deficiência hídrica.

A implantação do experimento foi realizada pelo sistema de mudas a partir de minitoletes, com o transplante realizado no último decêndio de novembro de 2017. O delineamento experimental foi de blocos casualizados com três repetições, sendo a unidade experimental representada por uma linha de quatro metros, com espaçamento de 1,4 metros entre linhas e 0,5 metros entre plantas.

Tabela 2. Relação dos genótipos avaliados, origem das famílias e nível de tolerância.

Genótipo	Família	NT*
RS/PR160001	BJ7504 X RB72454	Tolerante
RS/PR160003	BJ7504 X RB72454	Sensível
RS/PR160005	BJ7504 X RB72454	Sensível
RS/PR160006	BJ7504 X RB72454	Médio Tolerante
RS/PR160007	BJ7504 X RB72454	Médio Tolerante
RS/PR160009	BJ7504 X RB72454	Tolerante
RS/PR160012	BJ7504 X RB72454	Sensível
RS/PR160014	BJ7504 X RB72454	Tolerante
RS/PR160018	RB72454 X BJ7504	Tolerante
RS/PR160021	RB72454 X BJ7504	Tolerante
RS/PR160022	RB72454 X BJ7504	Médio Tolerante
RS/PR160023	RB72454 X BJ7504	Sensível
RS/PR160026	RB93509 X RB92579	Sensível
RS/PR160027	RB93509 X RB92579	Sensível
RS/PR160033	RB93509 X RB92579	Sensível
RS/PR160034	RB93509 X RB92579	Sensível
RS/PR160036	RB93509 X RB92579	Médio Tolerante
RS/PR160039	RB93509 X RB92579	Sensível
RS/PR160040	RB93509 X RB92579	Sensível
RS/PR160043	RB867515 X RB92579	Tolerante
RS/PR160047	RB867515 X RB92579	Médio Tolerante
RS/PR160049	RB867515 X RB92579	Tolerante
RS/PR160050	RB867515 X RB92579	Tolerante
RS/PR160051	RB867515 X RB92579	Tolerante
RS/PR160053	RB867515 X RB92579	Tolerante

NT* Nível de tolerância observado em ambiente controlado em fase adulta conduzida em vasos.

Foram avaliadas características biométricas e visuais, caracterizando os genótipos quanto ao desempenho agronômico. Aos seis meses após o transplante, foi realizada a avaliação visual de vigor (nota 1 a 5 – 1: maior vigor e 5: menor vigor)

e da reação dos genótipos à doença ferrugem marrom (*Puccinia melanocephala*) (escala de notas de 1 à 9, conforme Amorin et al., 1986), patógeno de maior incidência na cultura. Aos 11 meses após o transplante foram avaliados os seguintes caracteres biométricos: número de perfilhos ou colmos por metro linear (NCM) – obtido através da contagem do número de perfilhos totais presentes em duas touceiras; estatura de colmos (ALT) - mensurado com o auxílio de uma trena, a partir do nível do solo até a primeira aurícula visível (folha +1); diâmetro de colmos (DIA) - mensurado no segundo entrenó acima do solo, com o auxílio de um paquímetro; Massa média de um colmo (MMC) - obtido através da média da massa de uma touceira amostrada no interior da parcela; tonelada de colmos por hectare (TCH) – estimado a partir da equação TCH = (M1C*10)/E, onde "E" refere-se ao espaçamento entre linhas de plantio; teor de sólidos solúveis totais do caldo (SST), avaliada em refratômetro digital e tonelada de brix por hectare (TBH) – estimado a partir da equação TBH = (TCH x SST)/100.

Os resultados das variáveis quantitativas foram submetidos à análise de variância, sendo as médias quando significativas agrupadas pelo método de Scott-knott, ao nível de 5 % de probabilidade. Foi realizada análise de dissimilaridade entre os genótipos, procedendo ao agrupamento pela distância Euclidiana Média, utilizando o método de agrupamento da ligação média entre grupo (UPMGA), com padronização prévia dos dados e considerando todos os caracteres avaliados, exceto TCH e TBH, devido à dependência residual. Todas as análises foram realizadas com auxílio do software Genes (CRUZ, 2013).

4.2. Caracterização molecular de genótipos de cana-de-açúcar

O experimento foi realizado no Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Clima Temperado. O material vegetal utilizado foi obtido a partir de folhas jovens oriundas dos genótipos instalados do experimento de campo, citado anteriormente, incluindo a avaliação das variedades comerciais: RB855156, RB867515, RB92579, RB966928 e RB975932, totalizando 30 genótipos (Tabela 3). Para extração de DNA, foram coletados aproximadamente 200mg dos tecidos vegetais, esses foram macerados com auxílio de nitrogênio líquido e aliquotados em tubos de 1,5 mL. Os tubos foram armazenados em ultrafreezer a -80ºC até o momento da extração de DNA.

O método de extração utilizado foi CTAB, descrito por Ferreira e Grattapaglia (1996). A quantificação e qualidade do DNA foram avaliadas em gel de agarose 1% por análise comparativa com o marcador λ DNA/ Hind III, corados com Gel Red (Biotium).

Tabela 3- Relação dos genótipos caracterizados molecularmente, identificação das amostras, origem das famílias e nível de tolerância.

ID	Genótipo	Família	NT
1	RS/PR160005	BJ7504 X RB72454	Sensível
2	RS/PR160007	BJ7504 X RB72454	Médio Tolerante
3	RS/PR160009	BJ7504 X RB72454	Tolerante
4	RS/PR160018	RB72454 X BJ7504	Tolerante
5	RS/PR160033	RB93509 X RB92579	Sensível
6	RS/PR160034	RB93509 X RB92579	Sensível
7	RS/PR160040	RB93509 X RB92579	Sensível
8	RS/PR160047	RB867515 X RB92579	Médio Tolerante
9	RS/PR160050	RB867515 X RB92579	Tolerante
10	RS/PR160051	RB867515 X RB92579	Tolerante
11	RS/PR160053	RB867515 X RB92579	Tolerante
12	**RB867515**	**Padrão**	**-**
13	**RB92579**	**Padrão**	**-**
14	**RB855156**	**Padrão**	**-**
15	**RB966928**	**Padrão**	**-**
16	**RB975932**	**Padrão**	**-**
17	RS/PR160003	BJ7504 X RB72454	Sensível
18	RS/PR160023	RB72454 X BJ7504	Sensível
19	RS/PR160049	RB867515 X RB92579	Tolerante
20	RS/PR160006	BJ7504 X RB72454	Médio Tolerante
21	RS/PR160039	RB93509 X RB92579	Sensível
22	RS/PR160026	RB93509 X RB92579	Sensível
23	RS/PR160022	RB72454 X BJ7504	Médio Tolerante
24	RS/PR160036	RB93509 X RB92579	Médio Tolerante
25	RS/PR160043	RB867515 X RB92579	Tolerante
26	RS/PR160012	BJ7504 X RB72454	Sensível
27	RS/PR160027	RB93509 X RB92579	Sensível
28	RS/PR160014	BJ7504 X RB72454	Tolerante
29	RS/PR160001	BJ7504 X RB72454	Tolerante
30	RS/PR160021	RB72454 X BJ7504	Tolerante

NT* Nível de tolerância observado em ambiente controlado em fase adulta conduzida em vasos.

Os marcadores moleculares utilizados no experimento foram do tipo SSR. Para esse estudo foram testados 8 *primers* (Tabela 4), selecionados entre os 31 *primers* sintetizados a partir do genoma da cana-de-açúcar, conforme artigo apresentado por Singh et al. (2010).

Tabela 4. Relação de *primers* utilizados para caracterização molecular de genótipos de cana-de-açúcar.

Primer	Primer Foward	Primer Reverse	Temp*
SCC05	F: CGC AAT CCA ATT CGT ACG TT	R: CAT TGG TTG CAC CAC AGT TC	60
SCC06	F: TAT TCC ACC GGG AAC AAG AA	R: GGG ATT GTA GCG ACG AGT TG	60
SCM18	F: CAT CAG TAT CAT TTC ATC TTG G	R: CAG TCA ACG TCG GGT AGA	55
SCM27	F: TTC TCT GAC TTC CAA TCC AA	R: ATC AAG CAC GCC CGC CTC	55
SOMS148	F: GAT GAC TCC TTG TGG TGG	R: CTT GAC GAC CCT GCT GCT	52
UGSM296	F: ATT ATC TAC ATT CAG ACA CGT CAC	R: ATC TTT GTT AGC AAT CCA TTA AG	55
UGSM312	F: AAC GTA TCT TTA TTT CCA TTC TTC	R: CTT TCA GTT CAA CTT TGG ATA AAT	58
UGSM585	F: GAA GAG GAGGAG AGG AGA AG	R: TGG GAT GGT TGT TGA CTG	53

*Temp= temperatura de anelamento

As reações de amplificação foram desenvolvidas em uma reação com GoTaq Green Master Mix (Promega), a partir do protocolo desenvolvido pelo fabricante, o volume final de cada reação foi de 12,5 µl, contendo 6,25 µl de GoTaq Master Green Mix, 1 µl de DNA e 1,25 µl de cada *primer* (*Foward* e *Reverse*) e 2,75 µl de H_2O ultrapura.

A amplificação foi constituída por 40 ciclos a 94°C por 1 minuto, 50°C a 60°C por 1 minuto (dependendo da temperatura específica para cada reação), 72°C por 1 minuto, e extensão final a 72°C por 5 minutos. As amplificações foram realizadas em termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems). Os fragmentos amplificados foram separados em gel de agarose 3% em tampão TBE 1X (Tris-Borato 90mM, EDTA 2mM), corados com Gel Red (Biotium). Para estimar o peso molecular de cada fragmento foi utilizado o Marcador de DNA 1kb Ladder Plus (Invitrogen).

Através da análise de todos os dados, foi gerada uma matriz de dados binários com o auxílio do programa NTSYS PC 2.10m (ROHLF, 2000). Utilizando-se o coeficiente de Dice (DICE, 1945) para o cálculo da similaridade genética, e com base nas matrizes de similaridade geradas, foi construído um dendrograma por meio do método de agrupamento da ligação média entre grupo (UPMGA).

5. Resultados e Discussão

5.1. Caracterização fenotípica de genótipos de cana-de-açúcar

As produtividades dos genótipos avaliados, em toneladas de colmos por hectare (TCH), toneladas de brix por hectare (TBH), os valores médios de sólidos solúveis totais (SST), altura de planta (ALT), massa média do colmo (MMC) e número de colmos por metro linear (NCM), encontram-se descritas na tabela 5. Segundo Landell; Bressiani (2008), os caracteres valor de °Brix, número de colmos por metro linear, altura de planta e diâmetro de colmo, são componentes determinantes para o potencial agrícola.

Em relação aos valores de TCH, houve variação entre as médias de produtividade de 142,9 e 46,9 t ha^{-1}, ocorrendo a formação de três grupos, onde o primeiro foi constituído por genótipos que apresentaram produtividades médias entre 142,9 e 110,7 t ha^{-1}, as médias do segundo grupo variaram entre 104,5 e 78,2 t ha^{-1}, e o terceiro grupo foi formado pelos genótipos RS/PR160014 e RS/PR160022, ambos com médias produtivas inferiores a 53,6 t ha^{-1}. A média geral dos genótipos avaliados foi de 105, 7 t ha^{-1}, superior à média nacional de 73,2 t ha^{-1} (CONAB, 2015), entretanto inferior ao valor encontrado por Härter et al. (2016) que obteve média superior a 115,3 t ha^{-1} ao avaliar nove variedades de cana-de-açúcar em quinta-soca.

Quanto ao TBH, observou-se a formação de 3 grupos distintos, onde o primeiro foi formado por genótipos que apresentaram produtividade média de toneladas de brix por hectare igual ou superior a 16,6, o segundo grupo constituído por genótipos que apresentaram médias entre 15,8 e 12,2 t °Brix ha^{-1}, e o terceiro constituído novamente pelos genótipos RS/PR160014 e RS/PR160022 apresentando média igual ou inferior a 6,7 t °Brix ha^{-1}. A média geral para a variável TBH foi de 16,2 t °Brix ha^{-1}, inferior às médias encontradas em estudos realizados por Antunes (2015) e Härter et al. (2016).

Para a variável SST, observa-se a formação de 4 grupos, sendo o primeiro constituído pelos genótipos RB855156, RS/PR160047, RS/PR160018, RS/PR160023, RS/PR160051, que obtiveram valores médios de °Brix de 19,5 a 17,6. Os grupos intermediários apresentaram médias com variações entre 16,7 e 15,9 e 15,6 e 14,4, respectivamente. Enquanto os genótipos que formaram o último grupo, obtiveram médias inferiores a 14,1°Brix.

Tabela 5. Valores médios de toneladas de colmo por hectare (TCH) e toneladas de brix por hectare (TBH), sólidos solúveis totais (SST), altura de planta (ALT), diâmetro do colmo (DIA), massa média do colmo (MMC), número de colmos por metro linear (NCM) para 28 genótipos de cana-de-açúcar.

Genótipo	TCH (t ha^{-1})	TBH (t °Brix ha^{-1})	SST (°Brix)	ALT (cm)	DIA (cm)	MMC (kg)	NCM	NT*
RS/PR160051	133,2 a	22,5 a	17,6 a**	171,1 a	2,87 b	0,73 b	25 a	T
RB867515	**137,8 a**	**22 a**	**15,9 b**	**156,7 b**	**2,9 b**	**0,93 a**	**20,7 a**	**-**
RB92579	**131,7 a**	**21,6 a**	**16,4 b**	**148,3 c**	**2,87 b**	**0,87 a**	**22 a**	**-**
RS/PR160001	142,9 a	20,8 a	14,6 c	137,2 c	2,83 b	0,93 a	21,3 a	T
RS/PR160049	116,4 a	20,4 a	16,7 b	159,4 b	2,6 c	0,77 b	21 a	T
RS/PR160006	123,3 a	19,3 a	15,6 c	182,8 a	2,53 c	0,87 a	20,7 a	MT
RS/PR160026	126,9 a	19,2 a	15,2 c	162,8 a	2,53 c	0,67 b	27,3 a	S
RS/PR160005	139,1 a	18,8 a	13,6 d	158,3 b	3,5 a	1,1 a	18 b	S
RS/PR160007	111,4 a	18,3 a	16,3 b	178,3 a	2,67 c	0,97 a	17,3 b	MT
RS/PR160023	101,7 b	18 a	17,7 a	158,9 b	2,9 b	0,83 a	18 b	S
RS/PR160050	131,7 a	17,9 a	13,8 d	164,5 a	3,27 a	1,13 a	16 b	T
RS/PR160012	115,7 a	17,8 a	15,4 c	142,8 c	2,4 c	0,63 b	26 a	S
RS/PR160033	117,9 a	17,3 a	14,7 c	155 b	2,7 c	0,8 a	20,7 a	S
RS/PR160018	91,4 b	16,6 a	18,3 a	170 a	2,73 b	0,87 a	15,3 b	T
RS/PR160047	85,2 b	15,8 b	18,6 a	187,2 a	2,63 c	0,73 b	16,7 b	MT
RS/PR160021	111,9 a	15 b	13,4 d	156,1 b	2,73 b	0,8 a	21,3 a	T
RS/PR160027	96,4 b	15 b	15,6 c	154,4 b	2,33 c	0,6 b	22,7 a	S
RS/PR160039	110,7 a	15 b	13,6 d	139,4 c	2,7 c	0,73 b	21,3 a	S
RB855156	**78,2 b**	**14,8 b**	**19,5 a**	**158,3 b**	**2,77 b**	**0,93 a**	**12 b**	**-**
RS/PR160036	104,5 b	14,8 b	14,4 c	142,8 c	2,77 b	0,7 b	20 a	MT
RS/PR160043	93,3 b	14,8 b	16,1 b	152,2 b	2,4 c	0,53 b	24,7 a	T
RS/PR160003	101,9 b	14,3 b	14,1 d	161,7 b	2,47 c	0,77 b	18,7 b	S
RS/PR160034	85,7 b	12,9 b	15 c	158,3 b	2,83 b	0,87 a	14 b	S
RS/PR160053	87,1 b	12,7 b	14,7 c	177,8 a	2,63 c	0,8 a	16 b	T
RS/PR160009	91,6 b	12,5 b	13,7 d	173,3 a	2,93 b	0,9 a	14,7 b	T
RS/PR160040	90 b	12,2 b	13,6 d	165 a	2,87 b	0,7 b	18 b	S
RS/PR160014	53,6 c	6,7 c	12,4 d	136,1 c	2,83 b	0,53 b	14,7 b	T
RS/PR160022	46,9 c	6,2 c	13,2 d	140,5 c	2,3 c	0,43 b	15,3 b	MT
Média	105,7	16,2	15,4	158,9	2,7	0,8	19,3	
CV [1](%)	18,4	18,6	7,2	7,3	7,8	19,7	22,3	

[1] CV: Coeficiente de variação; NT* Nível de tolerância observado em ambiente controlado em fase adulta conduzida em vasos. Onde T= tolerante, MT= médio tolerante e S= sensível; **Médias seguidas de mesma letra na coluna pertencem ao mesmo grupo, ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste de Scott-knott.

Em relação à altura de planta, entre os genótipos avaliados houve variação de 136,1 a 187,2 cm. Para esse caractere os genótipos foram separados em três grupos, sendo que o primeiro apresentou valores médios entre 187,2 e 162,8 cm, o grupo intermediário apresentou valores médios entre 161,7 e 152,2 cm, e o terceiro grupo foi composto por genótipos que apresentaram altura média inferior a 149 cm.

O diâmetro do colmo, variou de 3,5 a 2,3 cm, e foram formados três grupos, sendo que o de maior valor foi composto pelos genótipos RS/PR160005 e RS/PR160050, que apresentaram diâmetro médio acima de 3 cm.

Para as variáveis MMC e NCM, houve a formação de dois grupos, sendo que para MMC, os valores médios variaram de 1,1 a 0,4 kg, e para a variável NCM os valores médios variaram de 27,3 a 12 colmos.

Foi realizada análise de dissimilaridade entre os genótipos, calculando a distância Euclidiana Média, utilizando o método de agrupamento da ligação média entre grupo (UPMGA) que originou a formação de 5 agrupamentos (Figura 7). Na tabela 6, estão descritos os valores médios por grupo, para as variáveis sólidos solúveis totais, altura de planta, diâmetro do colmo, massa média do colmo, número de colmos por metro linear, toneladas de colmo por hectare e toneladas de brix por hectare, entre os 28 genótipos avaliados.

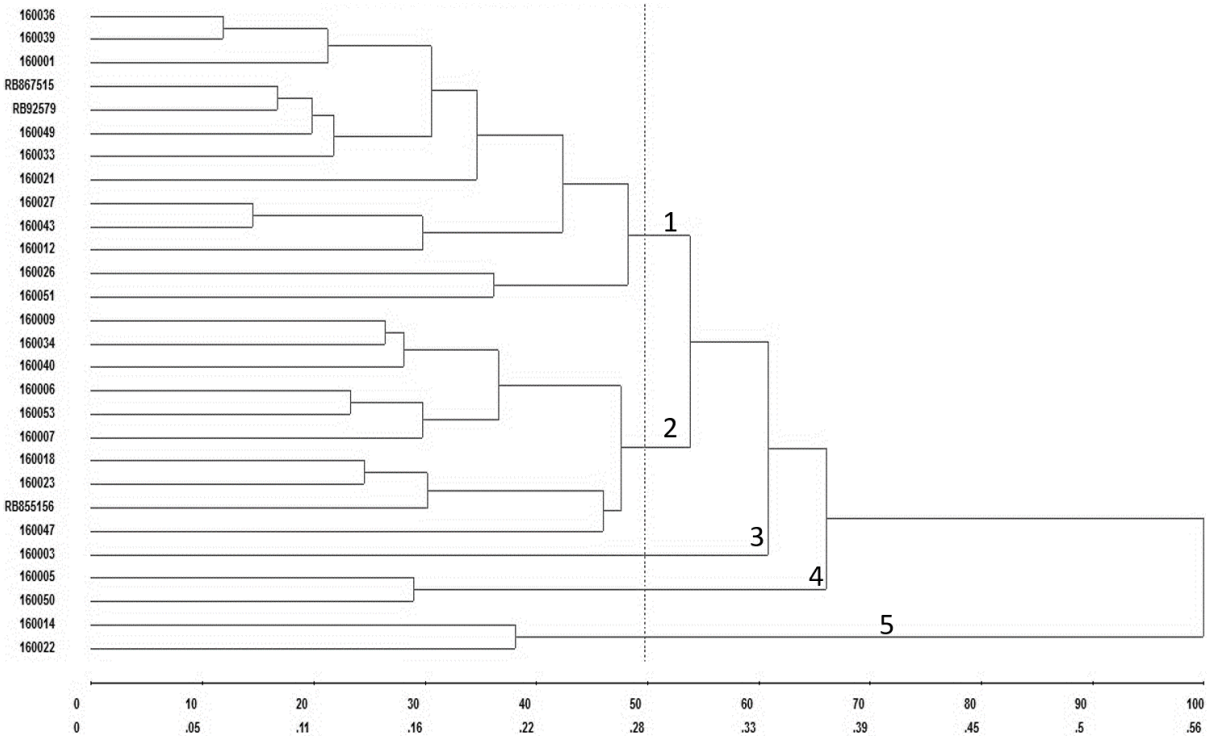

Figura 7- Dendrograma de 28 genótipos de cana-de-açúcar obtido a partir da análise de dissimilaridade pela distância Euclidiana Média, utilizando o método de agrupamento de ligação média entre grupo (UPGMA).

O grupo 1 é composto pelo maior número de genótipos, totalizando 13 e apresentou para a variável SST valor médio de 15,3° brix, para altura de planta 152,2 cm, os valores médios de produtividade para TCH e TBH, foram de 118,4 e 18,2 t ha^{-1}, respectivamente. O grupo foi superior aos demais, quando considerada a

variável número de colmos por metro linear, onde o grupo 1 apresentou média de 22,6 colmos.

No grupo 2 foram agrupados 10 genótipos, esse grupo apresentou médias superiores aos demais em relação as variáveis SST e altura de planta, apresentando médias de 16,3 Brix e 171 cm, respectivamente.

O grupo 3 foi constituído apenas pelo genótipo RS/PR160003, que apresentou valor médio para a variável SST de 14,1° Brix, apresentando valor intermediário comparado aos grupos 1, 2, 4 e 5. Esse genótipo, também apresentou a segunda maior nota para reação à ferrugem marrom, com valor médio de 5,3, e nota geral média de 3,3. Em relação às produtividades médias, o genótipo apresentou 101,9 t ha^{-1}e 14,3 t °Brix ha^{-1}.

No grupo 4 foram agrupados dois genótipos, RS/PR160005 e RS/PR160050, que destacaram-se dos demais, pelo alto potencial produtivo, apresentando para as variáveis TCH e TBH, respectivamente, os valores médios de 135,4 t ha^{-1}e 18,4 t °Brix ha^{-1}. Esse grupo também obteve a melhor média para a variável nota geral, igual a 2,5.

O grupo 5 foi formado por dois genótipos, constituindo o grupo que apresenta os menores valores de SST, altura de planta, diâmetro do colmo, número de colmos por metro linear e consequentemente menor TCH e TBH. Esse grupo também apresentou os maiores valores médios para reação à ferrugem marrom e nota geral média de 4,2 (considerada ruim).

Tabela 6. Valores médios de sólidos solúveis totais (SST), altura de planta (ALT), diâmetro do colmo (DIA), massa média do colmo (MMC); número de colmos por metro linear (NCM), reação a Ferrugem (FER), nota geral (NG), toneladas de colmo por hectare (TCH) e toneladas de brix por hectare (TBH) para o agrupamento via análise de dissimilaridade pela distância Euclidiana Média entre 28 genótipos de cana-de-açúcar.

Grupo		N° clones	SST	ALT	DIA	MMC	NCM	FER	NG	TCH	TBH
1		13	15,3	152,2	2,7	0,7	22,6	0,1	2,8	118,4	18,2
2		10	16,3	171,0	2,7	0,8	16,3	0,2	2,7	94,6	15,3
3		1	14,1	161,7	2,5	0,8	18,7	5,3	3,3	101,9	14,3
4		2	13,7	161,4	3,4	1,1	17,0	0,0	2,5	135,4	18,4
5		2	12,8	138,3	2,6	0,5	15,0	7,0	4,2	50,2	6,5
Média	-	-	15,3	158,9	2,7	0,8	19,3	0,8	2,9	105,7	16,2
Total	5	28	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Com base nas avaliações do desempenho agronômico (tabela 4), verifica-se que há genótipos promissores, tanto para produtividade de colmos como também

para qualidade e riqueza quando comparamos seu desempenho com os das testemunhas RB867515 e RB855156.

5.2. Caracterização molecular de genótipos de cana-de-açúcar

A divergência genética pode ser estimada baseada na utilização de descritores morfo-agronômicos, entretanto sabe-se que esses podem ser influenciados por fatores ambientais. Por outro lado, o uso de marcadores moleculares, pode ser aplicado para estimativa da divergência genética. A utilização dessas ferramentas é altamente recomendada e permite analisar a variabilidade em nível de DNA, o que possibilita obter um agrupamento de genótipos com características semelhantes. Nesse sentido, os marcadores moleculares destacam-se por não serem influenciados pelo ambiente.

Neste trabalho, foram gerados 217 marcadores a partir dos produtos da amplificação de DNA de 30 genótipos avaliados com os 8 *primers* SSR. Nas figuras 8, 9 e 10 encontram-se o perfil obtido após a separação dos produtos da PCR em gel de agarose 3%, dos *primers* SOMS148, UGSM585 e SCC06.

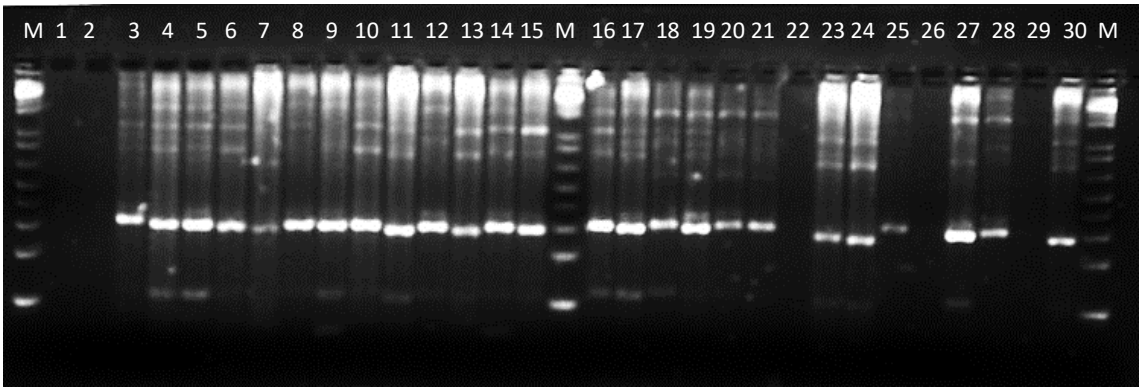

Figura 8- Perfil de bandas obtido com o par de *primers* SOMS148, para as 30 amostras de DNA avaliadas, onde a letra M indica o marcador 1kb plus.

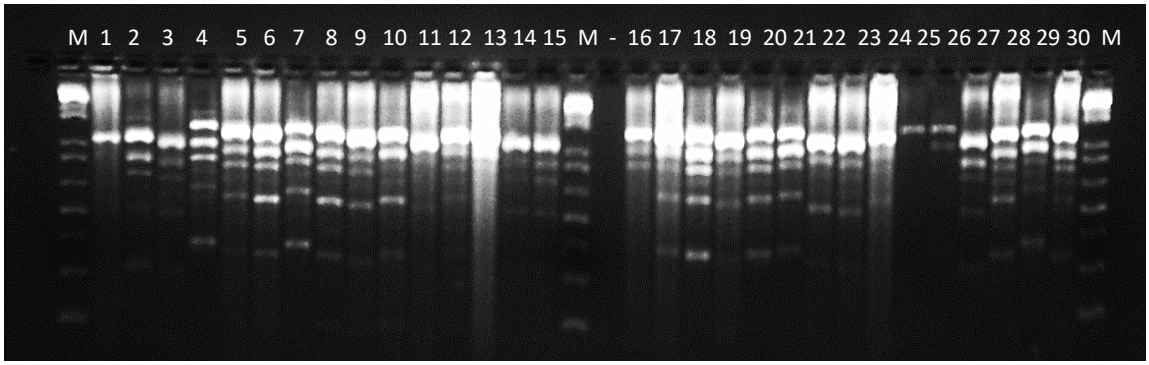

Figura 9- Perfil de bandas obtido com o par de *primers* UGSM585, para as 30 amostras de DNA avaliadas, onde a letra M indica o marcador 1kb plus.

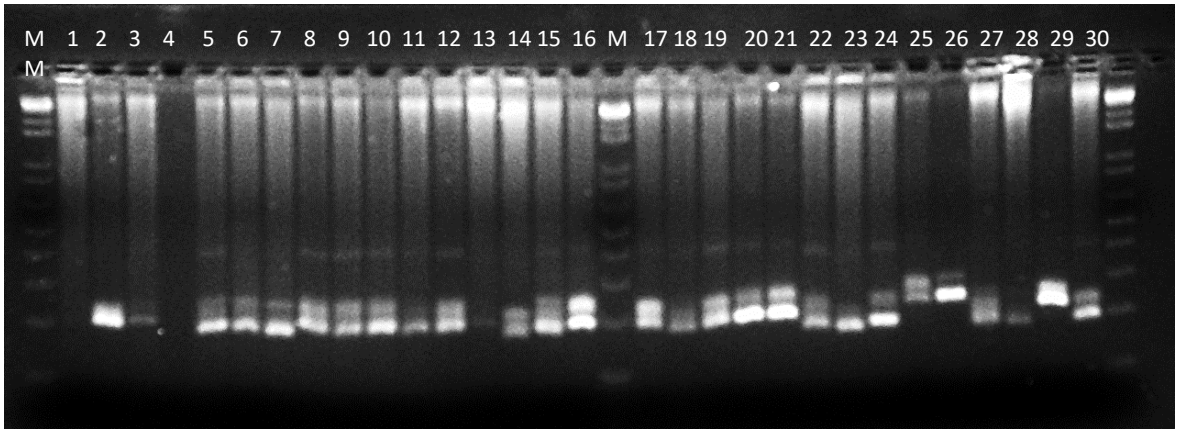

Figura 10- Perfil de bandas obtido com o par de *primers* SCC06, para as 30 amostras de DNA avaliadas, onde a letra M indica o marcador 1kb plus.

A partir da análise dos dados, foi gerada uma matriz de dados binários, onde foi utilizado o coeficiente de Dice para o cálculo da similaridade genética, e com base nas matrizes de similaridade geradas, foi construído um dendrograma por meio do método de agrupamento UPGMA, baseado nos padrões de bandas dos marcadores SSR (Figura 11).

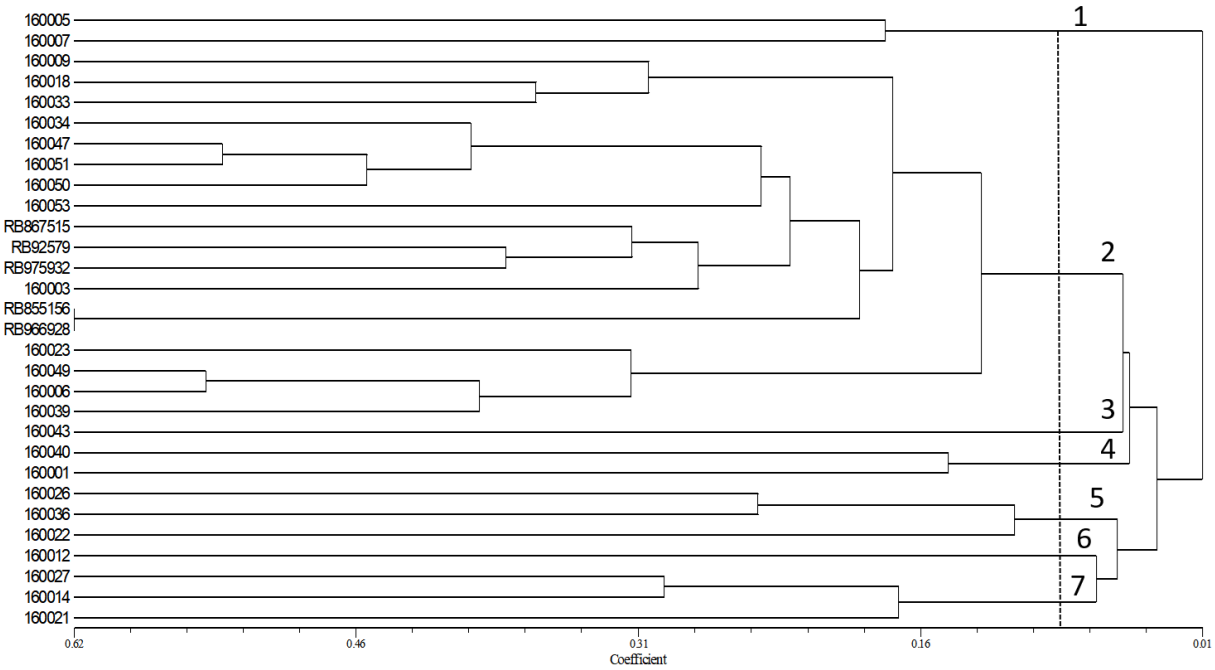

Figura 11- Dendrograma de 30 genótipos de cana-de-açúcar obtido a partir da análise de microssatélite utilizando o índice de similaridade de DICE e o método de agrupamento de ligação média entre grupo (UPGMA).

O coeficiente de correlação cofenético entre a matriz de dissimilaridade obtida pelo complemento aritmético do coeficiente de Dice e a matriz cofenética foi de r =

0,86. Isso indica a precisão entre os valores originais de dissimilaridade e os representados no dendrograma.

Para as variáveis utilizadas, quando comparados dados fenotípicos e moleculares, observa-se que não houve relação entre eles; dessa forma, não foi possível associar características morfológicas a algum caractere molecular, o que era esperado porque os *primers* específicos para seleção de tolerância ao déficit hídrico não foram sintetizados a tempo da conclusão deste trabalho.

A similaridade média entre os genótipos foi de 0,86, a utilização desse valor como critério para separação dos grupos, deu origem a 7 agrupamentos. O grupo I foi composto pelos genótipos RS/PR160005 e RS/PR160007 que ficaram isolados dos demais. Já o grupo II foi formado por 18 genótipos, incluindo as 5 variedades padrão. Nesse agrupamento observa-se a formação de dois subgrupos, sendo um deles composto apenas pelos genótipos RS/PR160023, RS/PR160049, RS/PR160006, RS/PR160039. O grupo III foi constituído apenas pelo genótipo RS/PR160043. O agrupamento IV foi formado pelos genótipos RS/PR160040 e RS/PR160001. Os genótipos RS/PR160022, RS/PR160026 e RS/PR160036 constituíram o grupo V. Assim como o grupo 3, o sexto grupo foi formado por um único genótipo, RS/PR160012. O sétimo agrupamento foi composto pelos genótipos RS/PR160014, RS/PR160021 e RS/PR160027.

Os genótipos que apresentaram maior similaridade entre si foram as variedades comerciais RB855156 e RB966928, este resultado confirma a relação destes genótipos, uma vez que a RB96692 é oriunda do cruzamento entre RB855156 x RB815690. O segundo maior nível de similaridade foi para os genótipos RS/PR160006 e RS/PR160049, e RS/PR160047 e RS/PR160051, respectivamente.

Em relação à analise molecular os resultados indicam uma boa separação entre os genótipos e mostram uma variabilidade genética importante nestas famílias para a o melhoramento.

6. Considerações finais

A variabilidade genética é fundamental para seleção e utilização em programas de melhoramento. Esta, pode ser estimada a partir da utilização de descritores morfo-agronômicos e através da utilização de marcadores moleculares.

Em relação à caracterização fenotípica, foi observado entre os genótipos avaliados, baixos valores médios para SST, entretanto apesar dos genótipos terem passado por períodos de déficit hídrico, em ambiente controlado e a campo (no período entre janeiro e fevereiro) houve bom desenvolvimento vegetativo, destacando-se diversos genótipos com boa sanidade, elevada produtividade de colmos e perfilhamento.

Quanto à caracterização molecular, o estudo possibilitou gerar um grande número de marcadores. No entanto, não foi possível relacionar esses resultados aos resultados fenotípicos, tendo em vista que foram utilizados *primers* disponíveis no Laboratório de Biologia Molecular, que não eram específicos para tolerância ao déficit hídrico, pois não foi possível sintetizar *primers* específicos a tempo de concluir o trabalho.

Com base nos resultados apresentados, é possível concluir que há variabilidade fenotípica e molecular entre os genótipos avaliados, que podem ser de interesse para o programa de melhoramento de cana-de-açúcar desenvolvido para a Região de clima temperado.

Os próximos passos para dar continuidade ao trabalho são a seleção e obtenção de novos *primers* específicos para características relacionadas ao déficit hídrico.

7. Referências Bibliográficas

ANTUNES, W. R.. **Desempenho de genótipos de cana-de-açúcar em cinco locais no Rio Grande do Sul.** 2015. 90 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2015.

ALMEIDA, A. C. S.; SOUZA, J. L.; TEODORO, I.; BARBOSA, G.V.S.; MOURA FILHO, G.; FERREIRA JÚNIOR, R. A. Desenvolvimento vegetativo e produção de variedades de cana-de-açúcar em relação à disponibilidade hídrica e unidades térmicas. **Ciência e Agrotecnologia**, v.32, p.1441-1448, 2008.

AMORIM, L.; BERGAMIN-FILHO, A.; SANGUINO, A.; CARDOSO, C.; MORAES, V.A.; FERNANDES, C.R. Metodologia de avaliação da ferrugem da cana-de-açúcar (Pucciniamelanocephala). **Boletim Técnico Copersucar**. São Paulo: Copersucar, v.39, n.1, p.13-16, 1987

BACCHI, M.R.P. **Interdependência dos mercados de gasolina C e de álcool combustível no Estado de São Paulo.** 2007. 150 p. Tese (Livre-Docência) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007

BACCHI, M. R. P.; CALDARELLI, C. E. Impactos socioeconômicos da expansão do setor sucroenergético no Estado de São Paulo, entre 2005 e 2009. **Nova econ**., Belo Horizonte, v. 25, n. 1, p. 209-224, Apr. 2015.

BALL, D. M.; HOVELAND, C. S.; LACEFIELD, G. D. **Southern forages.** 4. ed. Lawrenceville, Georgia: International Plant Nutrition Institute (IPNI), 2007. 322 p.

BASNAYAKE, J.; JACKSON, P. A.; INMAN-BAMBER, N. G.; LAKSHMANAN, P. Sugarcane for water-limited environments. Variation in stomatal conductance and its genetic correlation with crop productivity. **Journal of Experimental Botany**, v. 66, n. 13, p. 3945-3958, 2015.

BERED, F.; BARBOSA NETO, F. J.; CARVALHO, F. I. F. Marcadores moleculares e sua aplicação no melhoramento genético de plantas. **Ciência Rural**, Santa Maria, RS, v. 27, p. 513-520, 1997.

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

BUSO G. S. C; CIAMPI A. Y.; MORETZSOHN M. C.; SOUZA Z. P. Protocolo para desenvolvimento de marcadores microssatélites. **Circular Técnica 20**, Embrapa Cenargen, Brasília DF, Brasil, 2003.

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

CHAGAS, A.L.S.;. TONETO, R. Jr; AZZONI, C.R.Sugarcane, land use and regional development. Texto para Discussão 009/2011. Programa de Pós-Graduação em Economia Aplicada - Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 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..

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO – CONAB. **Acompanhamento da Safra Brasileira de Cana-de-açúcar, Terceiro levantamento, safra 2015/16,** V. 2, p. 1-65, Brasília, 2015.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO – CONAB. **Acomp. safra bras. cana, v. 5 - Safra 2018/19**, n. 2 - Segundo levantamento, Brasília, p. 1-86, agosto 2018. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cana/boletim-da-safra-de-cana-de-acucar>. Acesso em: 28 out. 2018.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO – CONAB. **Acomp. safra bras. cana, v. 4 - Safra 2017/18, n. 4 - Quarto levantamento**, Brasília, p. 1-73, abril 2018. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cana/boletim-da-safra-de-cana-de-acucar>. Acesso em: 02 set. 2018.

CRUZ, C.D. GENES - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum**. v.35, n.3, p.271-276, 2013.

DIOLA, V; SANTOS, F. A. Physiology. In: Santos, Boremand Caldas. (Org.). **Sugarcane: Bioenergy, Sugar and Ethanol**. 01ed.Viçcosa: Editora UFV, 2012, v. 01, p. 23-45.

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

DUTRA FILHO, J. A. et al . Utilização de marcadores moleculares RAPD e EST's SSR para estudo da variabilidade genética em cana-de-açúcar[1]. **Rev. Ciênc. Agron**., Fortaleza , v. 44, n. 1, p. 141-149, Mar. 2013 .

FERRARI, F. **Caracterização cromosssômica em cana-de-açúcar (Saccharum spp., Poaceae)**. 2010. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP, Brazil

FERREIRA. M.E.; GRATIAPAGLIA D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análises genéticas**. 3.ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998.220 p.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). **FAOSTAT**. 2018 Disponível em: <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>. Acesso em: 28 out. 2018.

GASCHO, G. J.; SHIH, S. F. Sugarcane. In: TEARE, I. D.; PEET, M. M. (Ed.). **Crop-water relations**. New York: Wiley Interscience, 1983.

HÄRTER, A., ANTUNES, W. R., DE CAMPOS, A. D. S., LEMOES, L. S., MACARENHAS, L. S., & DOS ANJOS, S. D. Desempenho agronômico de variedades de cana-de-açúcar avaliadas em quinta soca. **Ciência & Tecnologia Fatec-JB**, v. 8, 2016.

HARTER, A. **Seleção avançada em cana-de-açúcar para tolerância ao déficit hídrico.** 2018. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pelotas.

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). **Censo Agropecuário 2017.** Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/estatisticas-novoportal/economicas/agricultura-e-pecuaria/21814-2017-censo-agropecuario.html > Acesso em 18/11/2018

INMAN-BAMBER, N.G.; SMITH, D.M. Water relations in sugarcane and response to water defi cits. **Field Crops Research**, v.92, p.185-202, 2005.

LANZA, M. A.; GUIMARÃES, C. T.; SCHUSTER, I.; Aplicação dos marcadores moleculares no melhoramento genético. Informe Agropecuário, Belo Horizonte, v. 21, n. 204, p. 97-108, 2000.

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

LECOEUR, J.; SINCLAIR, R.T. Field pea transpiration and leaf growth in response to soil water deficits. **Crop Science**, Madison, v.36, p.331-335, 1996

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

McCREE, K. J.; FERNÁNDEZ, C. J. Simulation model for studyng physiological water stress responses of whole plants. **Crop Science**, Madison, v.29, p.353-360, 1989.

MILES C, WAYNE M Quantitative trait locus (QTL) analysis. **Nature Education** 1: 208, 2008.

MOLINARI, H. B. C. **Expressão estresse-induzida do gene P5CS em plantas transgênicas de cana-de-açúcar submetidas ao déficit hídrico**. 2006.

OLIVEIRA, K. M. **Desenvolvimento de marcadores moleculares EST-SSRs e mapeamento funcional em cana-de-açúcar (Saccharum, spp.).** Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas, 2006.

ORTOLANI, A.A.; CAMARGO, M.B.P. Influência dos fatores climáticos na produção. In: CASTRO, P.R.C.; FERREIRA, S.O.; YAMADA, T. **Ecofisiologia da produção agrícola**. Piracicaba: Instituto da Potassa e Fosfato, 1987. p.71-100.

PINTO, L. R. Marcadores moleculares. **Revista Opiniões**, Ribeirão Preto, v. 3, n. 1, p. 40, 2008.

RESENDE, M. D. V.; LOPES, P.S.; SILVA, R. L.; PIRES, I. E. Seleção genômica ampla (GWS) e maximização da eficiência do melhoramento genético. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 56, p. 63-78, 2008.

RIBEIRO DO VALE, F.X., PARLEVLIET, J.E. & ZAMBOLIM, L. Concepts in plant disease resistance. **Fitopatologia Brasileira** 26:577- 589. 2001.

SANTOS, R. F.; CARLESSO, R. Déficit hídrico e os processos morfológico e fisiológico das plantas. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 2, n. 3, p. 287-294, 1998.

SALIENDRA, N.Z.; MEINZER, F.C.; PERRY, M.; THOM, M. Associations between partitioning of carboxylase activity and bundle sheath leakiness to CO2, carbon isotope discrimination, photosynthesis, and growth in sugarcane. **Journal of Experimental Botany**, v.47, p.907-914, 1996.

SINGH, R.K.; MISHRA, S.K.; SINGH, S.P.; MISHRA, N.; SHARMA, M.L..Evaluation of microsatellite markers for genetic diversity analysis among sugarcane species and comercial hybrids. **Australian Journal of Crop Science**. Australia, v.4, n.2, p.116-125, 2010.

SMIT, M.A.; SINGELS, A. The response of sugarcane canopy development to water stress. **Field Crops Research**, v.98, p.91-97, 2006.

SPAVOREK, G.; BARRETO, A.; BERNDES, G.; MARTINS, S., MAULE, R. Environmental, land-use and economic implications of Brazilian sugar cane expansion 1996-2006**. Mitig Adapt Strateg Glob Change**, p. 285-298, 2009.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant Physiology**. California: The Benjamim Cummings Publishing Company, Inc., Redwood City, 1991.

TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MOLLER, I. M.; MURPHY, A. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal.** 6. ed. Porto Alegre-RS: Artmed, 2017. 888 p.

TOLEDO E. R.; LEANDRO R. A.; SOUZA JUNIOR C. L.; Souza A. P. Mapeamento de QTLs: uma abordagem bayesiana. **Revista Brasileira de Biometria** 26: 107-114, 2008.

TURCHETTO-ZOLET, A.C.; TURCHETTO, C.; ZANELLA, C. M.; PASSAIA, G. **Marcadores Moleculares na Era Genômica: Metodologias e Aplicações**. 1. ed. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética. v. 1. 181p, 2017.

VIANNA, M. S.; SENTELHAS, P. C. Simulação do risco de déficit hídrico em regiões de expansão do cultivo de cana-de-açúcar no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.49, p.237-246, 2014.

VIGHI, I. L. **Estresses abióticos em arroz: respostas moleculares, bioquímicas e fisiológicas.** 111F. Tese (doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2016.

WALTER, A.; DOLZAN, P.; QUILODRÁN, O.; GARCIA, J.; SILVA, C. DA; PIACENTE, F.; SEGERSTEDT, A. A sustainability analysis of the Brazilian ethanol In: **Biocombustível brasileiro: uma análise de sustentabilidade**. Texto para discussão: UNICAMP, Campinas, 2008.