



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO PRODUÇÃO VEGETAL**



**DIVERGÊNCIA GENÉTICA EM GENÓTIPOS DE CANA-DE-  
AÇÚCAR (*Saccharum* spp.) ATRAVÉS DE CARACTERES  
MORFOAGRONÔMICOS E POR MARCADORES MOLECULARES**

**RIO LARGO  
ALAGOAS-BRASIL  
2006**

**PAULO PEDRO DA SILVA**

**DIVERGÊNCIA GENÉTICA EM GENÓTIPOS DE CANA-DE-  
AÇÚCAR (*Saccharum* spp.) ATRAVÉS DE CARACTERES  
MORFOAGRONÔMICOS E POR MARCADORES MOLECULARES**

**Dr. Lailton Soares**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Alagoas, como parte dos requisitos do Curso de Mestrado em Agronomia (Produção Vegetal), para obtenção do título de “Magister Scientiae”.



**U F A L**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO PRODUÇÃO VEGETAL**



**C E C A**

**RIO LARGO  
ALAGOAS-BRASIL  
2006**

**Catálogo na fonte**  
**Universidade Federal de Alagoas**  
**Biblioteca Central**  
**Divisão de Tratamento Técnico**  
**Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale**

S586d Silva, Paulo Pedro da.  
Divergência genética em genótipos de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) através de caracteres morfoagronômicos e por marcadores moleculares / Paulo Pedro da Silva. – Rio Largo, 2006.  
96 f.: il. tabs., grafs.

Orientador: Lailton Soares.  
Dissertação (mestrado em Agronomia: Produção Vegetal) – Universidade Federal de Alagoas. Centro de Ciências Agrárias. Rio Largo, 2006.

Inclui bibliografia.  
Anexos: f. [80]-96.

1. Cana-de-açúcar – Melhoramento genético. 2. *Saccharum* spp. 3. Análise Multivariada. 4. Marcadores moleculares. I. Título.

CDU: 633.61

RIO LARGO, ESTADO DE ALAGOAS

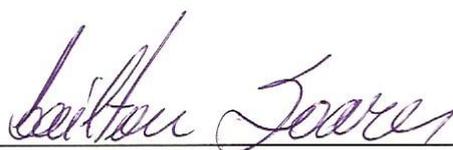
AGOSTO DE 2006

TERMO DE APROVAÇÃO

PAULO PEDRO DA SILVA  
2004M21D014S-4

**DIVERGÊNCIA GENÉTICA EM GENÓTIPOS DE CANA-DE-AÇÚCAR  
(*Saccharum* spp.) ATRAVÉS DE CARACTERES MORFOAGRONÔMICOS  
E POR MARCADORES MOLECULARES**

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre do Curso de Pós-graduação em Agronomia, Área de Concentração Produção Vegetal da Universidade Federal de Alagoas, pela seguinte banca examinadora:



Prof. Dr. Lailton Soares (CECA/UFAL)

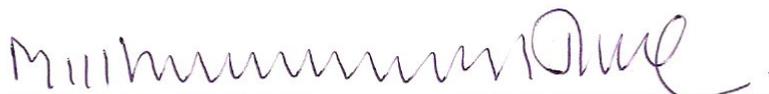
**Orientador**



Prof. Dr. Cícero Eduardo Ramalho Neto (CECA/UFAL)



Prof. Dr. Paulo Vanderlei Ferreira (CECA/UFAL)



Dr. Marcondes Maurício de Albuquerque (CPATC-EMBRAPA)

Aos meus pais, José Pedro Filho e Angelita Josefina da Conceição, pelo carinho, por ter sempre acreditado em mim, pelo esforço e incentivo, e a todos os meus irmãos, especialmente àqueles que vi crescer, Frausa Angelita da Silva, Mauro Pedro da Silva, Ana Angelita da Silva e Manoel Pedro da Silva. Ao grandioso amigo Pe. Zenício Martiniano “in memória”, pela amizade construída.

**OFEREÇO**

À minha esposa Josefa Socorro da Silva, pelo amor, companheirismo, apoio e à minha querida e estimada filha Samyra Guadalupe.

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

A **Deus** pela vida concebida, conquistas realizadas, força e coragem para driblar, enfrentar e superar dificuldades e obstáculos em minha jornada, e fortalecimento no caminho que sigo.

À Universidade Federal de Alagoas, pela oportunidade de realizar este curso.

À Coordenação do Curso de Mestrado em Agronomia “Produção Vegetal”, do CECA/UFAL.

Ao Prof. Dr. Lailton Soares, por sua orientação e ensinamentos que muito contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Cícero Eduardo Ramalho Neto, por sua colaboração na execução do trabalho relacionada à parte de análise molecular.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudo.

Ao PMGCA do CECA-UFAL pelo suporte financeiro para realizar este trabalho.

Aos Professores Geraldo Veríssimo de Sousa Barbosa e Marcelo de Menezes Cruz, pela amizade construída.

À Usina Santa Clotilde, pelo suporte e apoio concedido, disponibilizando a área e conduzindo o ensaio experimental nas condições de campo.

Aos colegas pesquisadores do PMGCA: Antonio José Rosário Sousa, Antonio Jorge de Araújo Viveiros, Antônio Maria Cardoso Rocha, Antônio Valeriano Pereira dos Santos, Carlos Alberto Guedes Ribeiro, Gaus Silvestre de Andrade Lima, João Messias dos Santos, José Leonaldo de Souza, José Lopes Cavalcante Ferreira, José Vieira Silva, Lailton Soares, Mauro Wagner de Oliveira, Paulo Ricardo Teixeira da Silva, Adeilson Mascarenhas de Oliveira Silva, Antônio Carlos Alves de Amorim, Edimundo Leobino da Silva, Edinaldo Martins da Silva, Eduardo Jorge Gomes de Almeida, Gilmar Odilon da Silva, Haroldo Oliveira Guedes, José Cícero Pereira, José Roberto Pedrosa Santiago, José Venício Correa da Silva, Petrônio Walquírio de Barros.

Aos estagiários do PMGCA/CECA/UFAL: Bruno Fernando Costa do Nascimento, Hugo Lyra Soriano, José Rodrigo de Araújo Guimarães, Joyce Silva Lima, Lucas Henrique Alves, Lucas Soares de Araújo, Magno Luiz de Abreu, Marcondes Inácio da Silva, Rômulo Pimentel Ramos, Saulo Ítalo de Almeida Costa e Weliton Tenório da Silva.

Aos colegas do Laboratório de Genética Molecular, Genômica e Proteômica (GEMPRO) do CECA/UFAL: Muciana Aracely da Silva Cunha, Janice Sales e Velber Xavier Nascimento, por compartilhar o ambiente de trabalho, tornando-o prazeroso e também pela amizade durante todo o período de desenvolvimento dos trabalhos.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram no desenvolvimento deste trabalho.

## **BIOGRAFIA DO AUTOR**

PAULO PEDRO DA SILVA é filho de José Pedro Filho e de Angelita Josefina da Conceição. Natural de Mar Vermelho, Alagoas, nasceu em 12 de dezembro de 1977.

É Técnico em Agropecuária pela Escola Agrotécnica Federal de Satuba-Alagoas (1996-1998), escola que lhe conferiu o título de “Aluno Destaque” por apresentar brilhante desempenho na sala de aula e campo.

Em 1999 ingressa no Curso de Agronomia do Centro de Ciências Agrárias (CECA) da Universidade Federal de Alagoas (UFAL). Durante a realização do curso executou várias atividades com iniciação a pesquisa científica. Foi monitor da disciplina Estatística e Experimentação Agrícola, por dois anos (2001 a 2002). Apresentando ótimo rendimento acadêmico, conclui o curso em 2004. Por ser considerado de alto nível seu desempenho no curso que ora conclui, recebe da UFAL não só o diploma que lhe confere o título de Engenheiro Agrônomo, mas também o de “Talento Agrônômico” por honra ao seu mérito alcançado.

No mesmo ano de 2004 ingressa no curso de Pós-Graduação Mestrado em Agronomia concentração em “Produção Vegetal” da mesma universidade, concluindo o curso em agosto de 2006.

## LISTA DE TABELAS

	página
<p><b>Tabela 1.</b> Caracteres quantitativos de cana-de-açúcar avaliados com 10 meses: DMC, NEC, AC, NF, AIF, NCP, NCT, NTP, agroindustriais: TCH, PUREZA, FIBRA, BRUX, POL, ATR e AR, obtidos com 14 meses, 2005/2006.....</p>	20
<p><b>Tabela 2.</b> Características morfológicas avaliadas em genótipos de cana-de-açúcar, com 10 meses, exceto brotação, perfilhamento e desenvolvimento, que foram avaliadas dois meses, 2005/2006.....</p>	27
<p><b>Tabela 3.</b> <i>Primers</i> RAPD utilizados na análise molecular RAPD dos 12 genótipos de cana-de-açúcar.....</p>	32
<p><b>Tabela 4.</b> <i>Primers</i> SSR testados para caracterização dos 12 genótipos de cana-de-açúcar.....</p>	34
<p><b>Tabela 5.</b> Quantificação da similaridade/dissimilaridade entre os genótipos <i>i</i> e <i>j</i>.....</p>	35
<p><b>Tabela 6.</b> Comparação de médias e resumo das análises de variância univariada dos caracteres Diâmetro médio do colmo (DMC), Altura do Colmo (AC), Número de Touceiras por Parcela (NTP), Número de Colmos por Touceira (NCT), Número de Colmos por Parcela (NCP), Número de Entrenós por Colmo (NEC), Número de Folhas (NF), Ângulo de Inserção da Folha (AIF), Percentagem de sólidos solúveis totais no caldo (BRUX), Tonelada de Cana por Hectare (TCH), Percentagem de sacarose aparente contida na cana (POL), Açúcares Redutores: glicose e frutose (AR), Percentagem de matéria seca insolúvel em água (FIBRA). Rio Largo-AL, 2006.....</p>	39

## LISTA DE TABELAS (Cont.)

	página
<b>Tabela 7.</b> Estimativas dos Coeficientes de Correlações Fenotípicas ( $r_F$ ), Genotípicas ( $r_G$ ) e de Ambiente ( $r_A$ ) entre quatro características estudadas (TCH, POL, AR e FIBRA) em 12 genótipos de cana-de-açúcar.....	41
<b>Tabela 8.</b> Medidas de dissimilaridade entre 12 genótipos de cana-de-açúcar em relação a quatro características (TCH, POL, AR e FIBRA) com base na Distância Euclidiana Média Padronizada.....	42
<b>Tabela 9.</b> Medidas de dissimilaridade entre 12 genótipos de cana-de-açúcar em relação a quatro características (TCH, POL, AR e FIBRA) com base na Distância Generalizada de Mahalanobis ( $D_{ii}^2$ ).....	45
<b>Tabela 10.</b> Agrupamento pelo Método de Tocher de 12 genótipos de cana-de-açúcar, com base na Distância generalizada de Mahalanobis ( $D_{ii}^2$ ) em relação a quatro características: TCH, POL, AR e FIBRA.....	46
<b>Tabela 11.</b> Contribuição relativa de cada variável ( $S_{.j}$ ) para divergência genética entre os 12 genótipos de cana-de-açúcar, segundo Singh (1981)..	49
<b>Tabela 12.</b> Estimativas dos autovalores ( $\lambda_j$ ) correspondentes às percentagens de variação explicadas pelos Componentes Principais e respectivos Coeficientes de Ponderação (Autovetores) das quatro características avaliadas (TCH, POL, AR e FIBRA) em 12 genótipos de cana-de-açúcar.....	50
<b>Tabela 13.</b> Escores dos 12 genótipos de cana-de-açúcar avaliados em relação aos três primeiros Componentes Principais, obtidos a partir de quatro caracteres TCH, POL, AR e FIBRA.....	51
<b>Tabela 14.</b> Coeficientes de similaridade genética através do índice de Jaccard entre 12 genótipos de cana-de-açúcar calculados a partir de dados baseados em 31 características morfológicas.....	54
<b>Tabela 15.</b> Número e tamanho dos fragmentos amplificados obtidos com as seqüências iniciadoras de RAPD utilizadas na análise genética de 12 genótipos de cana-de-açúcar.....	57
<b>Tabela 16.</b> Valores dos coeficientes de similaridade genética através do índice de Jaccard entre 12 genótipos de cana-de-açúcar obtidos a partir de dados binários da amplificação de 11 primers através de marcadores moleculares RAPD.....	58

## LISTA DE TABELAS (Cont.)

	página
<b>Tabela 17.</b> Menores valores, maiores valores, médias e amplitude para os coeficientes de similaridade de Jaccard gerados a partir de dados morfológicos mais RAPD e através dos coeficientes de dissimilaridade para caracteres quantitativos por meio das Distâncias Euclidiana Média Padronizada e $D_{ii}^2$ Mahalanobis entre 12 genótipos de cana-de-açúcar analisados.....	62
<b>Tabela 18.</b> Correlação entre a divergência genética estimada através da caracterização morfológica, molecular (RAPD), Distância Euclidiana Média Padronizada e estatística $D_{ii}^2$ de Mahalanobis.....	63

## LISTA DE FIGURAS

	página
<b>Figura 1.</b> Dendrograma entre 12 genótipos de cana-de-açúcar pelo método de agrupamento do “Vizinho mais Distante” utilizando como medida de dissimilaridade a Distância Euclidiana média padronizada.....	43
<b>Figura 2.</b> Dendrograma entre 12 genótipos de cana-de-açúcar pelo método UPGMA utilizando como medida de dissimilaridade a Distância Euclidiana Média Padronizada.....	44
<b>Figura 3.</b> Dendrograma obtido com a técnica de agrupamento pelo método “Vizinho mais Distante” utilizando como medida de dissimilaridade a Distância Generalizada de Mahalanobis ( $D_{ii'}^2$ ).....	47
<b>Figura 4.</b> Dendrograma utilizando o método de agrupamento UPGMA com base na Distância Generalizada de Mahalanobis ( $D_{ii'}^2$ ).....	47

## LISTA DE FIGURAS (Cont.)

	página
<b>Figura 5.</b> Dispersão gráfica dos escores, em relação aos eixos representativos dos três primeiros Componentes Principais (CP1, CP2 e CP3) de quatro caracteres avaliados em 12 genótipos de cana-de-açúcar.....	52
<b>Figura 6.</b> Dendrograma representativo da divergência genética obtido pela técnica de agrupamento UPGMA, utilizando o coeficiente de similaridade de Jaccard, com base em 31 caracteres qualitativos de 12 genótipos de cana-de-açúcar.....	55
<b>Figura 7.</b> Polimorfismo detectado por RAPD em 12 genótipos de cana-de-açúcar utilizando o primer OPA 9. Primeira e última linha: marcador 1kb Ladder. 1-RB9364, 2-RB931011, 3-RB94503, 4-RB93509, 5-RB72454, 6-RB951541, 7-SP79-1011, 8-RB931530, 9-RB92579, 10-RB931003, 11-RB961, 12-RB931611.....	56
<b>Figura 8.</b> Dendrograma representativo da divergência genética obtido pela técnica de agrupamento UPGMA, a partir da matriz de similaridade baseado no coeficiente de similaridade de Jaccard, considerando os 11 primers de RAPD, em relação a 12 genótipos de cana-de-açúcar.....	59

## RESUMO

Este trabalho teve como objetivos a estimação da divergência genética entre genótipos de cana-de-açúcar, por meio de caracteres morfoagronômicos e marcadores moleculares, e verificar a relação entre esses procedimentos. Foi conduzido um experimento em Rio Largo, AL, utilizando o delineamento em blocos casualizados com quatro repetições. Para a análise dos caracteres quantitativos foi utilizada a análise multivariada de Componentes Principais, divergência genética a partir da Distância Generalizada  $D_{ii}^2$  de Mahalanobis e Distância Euclidiana Média Padronizada. Com base nestas distâncias, realizaram-se análise de agrupamento pelo método “Hierárquico do Vizinho mais Distante” e método UPGMA, além de Tocher para  $D_{ii}^2$ . Na avaliação da divergência genética por meio de marcadores moleculares e caracteres morfológicos, utilizou-se o coeficiente de Jaccard e agrupamento UPGMA. As inconsistências quanto à formação de diferentes grupos entre a Distância Euclidiana Média Padronizada e a Distância  $D_{ii}^2$  de Mahalanobis caracterizam estas duas estimativas como medidas de dissimilaridade distintas. Da mesma forma as técnicas de agrupamento pelo método do “Vizinho mais Distante” e por UPGMA evidenciam dispersões gráficas não coincidentes, com diferenças quanto ao número de grupos e ao padrão de agrupamento, ao passo que o agrupamento por UPGMA e obtido por Tocher apresentaram a mesma concordância. A Distância  $D_{ii}^2$  de Mahalanobis correspondeu à técnica de Componentes Principais, por apresentarem os mesmos grupos formados por Tocher e UPGMA, obtidos a partir de  $D_{ii}^2$ . No entanto, estas técnicas não indicaram concordância com a Distância Euclidiana Média Padronizada. A correlação entre a divergência genética através de caracteres morfológicos e a estimada por marcadores moleculares foi significativa, porém, de média magnitude ( $r = 0,47$ ), indicando serem medidas complementares. Não houve correlação significativa para a divergência obtida por meio de características quantitativas com os caracteres morfológicos e marcadores moleculares, obtida pelos diferentes estimadores, assim como, entre a Distância Euclidiana Média Padronizada e a  $D_{ii}^2$  de Mahalanobis, o que indica claramente não existir qualquer relação entre estas estimativas.

**Palavras chave:** *Saccharum* spp, análise multivariada, divergência genética, técnicas de agrupamento, marcadores moleculares.

## ABSTRACT

This study had as objective to estimate the genetic divergence among sugarcane genotypes by means of morphoagronomical characters and molecular markers, and to verify the relation between these procedures. An experiment was conducted in Rio Largo, AL, using a randomized block design with four repetitions. The multivariate analysis of Principal Components, the genetic divergence based on the Mahalanobis  $D_{ii}^2$  Generalized Distance, and the Average Euclidean Distance Standardized were used for the analysis of the quantitative characters. Based on these distances, a grouping analysis was performed by the "More Distant Neighbor" method and the UPGMA method, besides Tocher for  $D_{ii}^2$ . Jaccard coefficient and UPGMA grouping were used in the evaluation of the genetic divergence by molecular markers and morphologic characters. The inconsistency as to formation of different groups between the Standardized Average Euclidean Distance and  $D_{ii}^2$  of Mahalanobis characterize these two estimates as measures of different dissimilarity. In the same way, the grouping techniques by the "More Distant Neighbor" method and by UPGMA show graphical dispersions that are not coincident, with differences in relation to the number of groups and in the grouping pattern, while the grouping by UPGMA and obtained by Tocher showed the same agreements. The  $D_{ii}^2$  Distance of Mahalanobis corresponded to the Principal Components technique, by showing the same groups made by Tocher and UPGMA, obtained from  $D_{ii}^2$ . However, these techniques did not indicate agreement with the Standardized Average Euclidean Distance. The correlation between the genetic divergence through morphologic characters and estimated by molecular markers was significant, however, from average magnitude ( $r = 0,47$ ), indicating to be complementary measurements. There was not significant correlation for the divergence obtained through quantitative characteristics with the morphologic characters and molecular markers obtained by the different estimators, as well as between Standardized Average Euclidean Distance and the Mahalanobis  $D_{ii}^2$ , which indicates clearly that there is no relation between these estimates.

**Key words:** *Saccharum* spp, Multivariate Analysis, Genetic Divergence, Cluster Analysis, Molecular Markers

## SUMÁRIO

	página
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	viii
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	xi
<b>RESUMO</b> .....	xiii
<b>ABSTRACT</b> .....	xiv
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	01
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	04
2.1 Características botânicas e base genética da cana-de-açúcar.....	04
2.2 Outros aspectos relacionados com a cana-de-açúcar.....	06
2.3 Importância e melhoramento da cana-de-açúcar.....	07
2.4 Uso de técnicas multivariadas.....	09
2.5 Caracterização e divergência genética: considerações gerais.....	11
2.5.1 Divergência genética estimada através da caracterização agronômica.....	13
2.5.2 Variabilidade genética estimada através de marcadores moleculares.....	15
<b>3 METODOLOGIA</b> .....	19
3.1 Genótipos estudados.....	19
3.2 Condução do Experimento para avaliação dos caracteres morfoagronômicos.....	19
3.3 Variabilidade genética a partir de caracteres quantitativos.....	20
3.3.1 Características quantitativas estudadas.....	20
3.3.2 Análise dos caracteres quantitativos.....	21
3.3.2.1 Medidas de divergência genética utilizadas.....	21
3.3.2.2 Distância Euclidiana Média Padronizada.....	22
3.3.2.3 Distância Generalizada $D_{II}^2$ de Mahalanobis.....	23
3.3.2.4 Análise da divergência por Componentes Principais.....	24
3.3.3 Diversidade genética a partir dos caracteres morfológicos e por marcadores moleculares.....	27
3.3.3.1 Características morfológicas consideradas.....	27
3.3.3.2 Obtenção de DNA para análise molecular.....	30
3.3.3.2.1 Execução do trabalho.....	30

**SUMÁRIO (Cont.)**

	página
3.3.3.2.2 Extração e isolamento do DNA.....	31
3.3.3.2.3 Concentração e pureza do DNA.....	32
3.3.3.2.4 Primers RAPD utilizados e condições da PCR.....	32
3.3.3.2.5 Primers SSR utilizados e condições das reações de amplificação.....	33
3.3.3.3 Análise da divergência genética para os caracteres morfológicos e moleculares.....	35
3.3.4 Comparação de relacionamento genético dos diferentes estimadores.....	36
3.3.5 Realização das análises estatísticas e técnicas de agrupamentos.	37
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>38</b>
4.1 Análise de variância e médias dos caracteres analisados.....	38
4.2 Correlações Fenotípicas, Genotípicas e de Ambiente entre os caracteres quantitativos utilizados para a determinação da divergência genética.....	40
4.3 Divergência genética através dos caracteres quantitativos.....	42
4.3.1 Distância Euclidiana Média Padronizada.....	42
4.3.2 Distância Generalizada $D_{ii}^2$ de Mahalanobis.....	44
4.3.3 Componentes Principais.....	49
4.4 Diversidade genética a partir de caracteres morfológicos e por marcadores moleculares.....	53
4.4.1 Caracteres morfológicos.....	53
4.4.2 Marcadores moleculares RAPD.....	55
4.4.3 Marcadores moleculares SSR.....	60
4.5 Relacionamento genético dos diferentes estimadores.....	61
<b>5 CONCLUSÕES.....</b>	<b>64</b>
<b>6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>67</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>80</b>
<b>APÊNDICES.....</b>	<b>86</b>

## 1 INTRODUÇÃO

---

A cana-de-açúcar está entre as culturas de maior expressão sócio-econômica do agronegócio brasileiro, devido à elevada mão-de-obra empregada no processo produtivo, produzindo cerca de 420 milhões de toneladas, destinadas à fabricação de açúcar e álcool, processadas em 306 usinas distribuídas em todo Brasil, (IBGE, 2006), destacando-se como maior produtor mundial desta cultura (ÚNICA, 2006).

A utilização de variedades melhoradas é o que tem permitido contínuo avanço na elevação da produtividade agroindustrial brasileira, mantendo o Brasil na liderança mundial. Estas variedades cultivadas atualmente são híbridos de sexta a décima geração, originárias de *Saccharum officinarum* L., com outras espécies, principalmente *S. spontaneum* L., *S. sinensi-baberi* e *S. robustum* (Matsuoka et al., 1999a), obtidas por hibridações realizadas pelos programas de melhoramento.

Para que se tenha êxito na condução de um programa de melhoramento, é necessário fundamentalmente que se tenha variabilidade genética dos progenitores envolvidos. O conhecimento da diversidade genética entre um grupo de genitores é importante para o melhoramento genético, sobretudo na identificação de combinações híbridas de maior heterozigose e maior efeito heterótico e, portanto, na recuperação de genótipos superiores em gerações segregantes.

A variabilidade genética quanto aos caracteres quantitativos é reduzida quando se utiliza genitores com pequena diversidade genética na formação de populações para hibridação, necessitando-se, portanto, de genitores com ampla diversidade genética.

Estudos sobre divergência genética têm sido de grande importância em programas de melhoramento envolvendo hibridação, por fornecerem parâmetros para a identificação de progenitores que, quando cruzados, possibilitam maior efeito heterótico na progênie e maior possibilidade de recuperar genótipos superiores nas gerações segregantes (Cruz, 1990; Soares, 1991). A identificação de progenitores superiores é feita, normalmente, através da avaliação detalhada de caracteres agrônômicos e morfológicos, cujo comportamento envolve o maior número possível de parâmetros.

A divergência genética tem sido avaliada com o objetivo de classificar os genótipos em grupos, facilitando desta forma a escolha de pais para os cruzamentos artificiais, tendo como base, medidas como a análise de variáveis canônicas (Goodman, 1968), métodos de agrupamento (Sneath e Sokal, 1973) e a estatística  $D_{ii}^2$  de Mahalanobis (Mahalanobis, 1936), entre outros.

A adoção de técnicas estatísticas apropriadas, como métodos multivariados, permitem combinar as múltiplas informações contidas na unidade experimental, de modo que seja possível executar a seleção, com base num complexo de variáveis, permitindo discriminar os genótipos mais promissores sob vários contextos, principalmente o genético (Cruz, 1990), o que possibilita direcionar os cruzamentos através da escolha de progenitores mais divergentes que deverão ser cruzados e, assim, obter genótipos superiores.

Atualmente, a tendência do melhoramento genético, independentemente da espécie a ser melhorada é a utilização e integração dos métodos tradicionais com as modernas técnicas biotecnológicas. Associadas a estes, os estudos de divergência genética e relações filogenéticas entre espécies vegetais de importância agrônômica têm merecido atenção cada vez maior, principalmente com o advento recente dos chamados marcadores moleculares (Duarte et al., 1999). Nesses trabalhos, os pesquisadores têm interesse em agrupar os indivíduos semelhantes, de forma que as maiores diferenças ocorram entre os grupos formados.

A adoção de técnicas genéticas bioquímicas tem sido também uma ferramenta utilizada na caracterização molecular e permite identificar diretamente o polimorfismo em nível de DNA. A adoção dessas técnicas moleculares para avaliação direta da variação de nucleotídeos apresenta maior precisão e resolução, tendo facilitado a análise para diferentes objetivos.

Os marcadores moleculares podem ser utilizados para as mais diversas aplicações no melhoramento genético de plantas (Ferreira e Grattapaglia, 1998; Borém e Santos, 2004), inclusive, na caracterização de variedades, por complementar as informações morfológicas e agronômicas, oferecendo informações mais detalhadas sobre sua natureza genética (Amorim, 2002), e, poder ser executada com tal precisão, que mesmo genótipos extremamente semelhantes sob o ponto de vista morfológico e agrônomo poderão ser diferenciados.

Segundo Federizzi (1998), a área de maior impacto dos marcadores moleculares no melhoramento vegetal é o emprego da seleção assistida para identificação de genótipos superiores em populações segregantes, além de permitir que a seleção e novos cruzamentos sejam realizados em uma mesma geração, podendo ser usados mesmo que não tenham sido mapeados (Ferreira e Grattapaglia, 1998).

A avaliação molecular através de marcadores moleculares tem possibilitado comparar diferentes genótipos e determinar sua variabilidade genética, o que tem permitido realizar cruzamentos de forma mais eficientes e proporcionar ganhos genéticos consideráveis.

O presente trabalho teve como objetivo caracterizar a variabilidade genética existente entre 12 genótipos de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) com relação aos caracteres morfoagronômicos, utilizando-se de procedimentos multivariados e através de DNA polimórfico, detectado através de marcadores moleculares e determinar a relação entre a divergência genética obtida pelas técnicas multivariadas e o polimorfismo gerado pelos marcadores moleculares utilizados.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

---

### 2.1 Características botânicas e base genética da cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar é uma espécie alógama, com ciclo perene e de grande porte, apresentando três prováveis regiões de origem, segundo vários relatos: Nova Guiné, China e Índia.

Esta cultura e espécies afins são membros da tribo Andropogoneae, cujo número básico de cromossomos é  $n = 10$ . Pertencente à família *Gramíneae* (Poaceae), gênero *Saccharum*, a qual é representada atualmente por seis espécies: *Saccharum officinarum* L., *S. spontaneum* L., *S. robustum* Brandes e Jeswiet ex Grassl, *S. barberi* Jeswiet, *S. sinense* Roxb, *S. edule* Hassk (Fauconnier e Bassereau, 1975; Bacchi, 1985; Pires, 1993; Borém, 1999; Matsuoka et al., 1999a).

Simmonds (1979) enfatiza que membros do gênero *Saccharum* são altamente poliplóides, e que existe uma elevada variabilidade interespecífica e muita aneuploidia, caracterizando indivíduos de várias constituições genéticas, oscilando de  $2n = 40$  até  $2n = 205$ , o que implica numa base genética complexa, não sendo conhecido até o presente nenhum diplóide com  $2n = 20$  cromossomos (Moura, 1990). Entretanto, apesar de não assumir herança diplóide, Hogarth (1987), relata que algumas evidências sugerem herança semelhante aos diplóides e que os desvios dessas suposições não seriam significativos.

A espécie *S. officinarum*  $2n = 80$  cromossomos é também conhecida por cana-nobre, termo criado pelos melhoristas holandeses em 1920 para referir a

esta espécie pelo seu elevado teor de açúcar. Esta é uma das principais espécies que contribuíram com genes para genótipos de cana-de-açúcar cultivados atualmente no mundo. Essa espécie é considerada um alopoliplóide, conforme Clements (1980). *S. sinense* ( $2n = 111$  a  $2n = 120$ ) é conhecida como cana da China, e *S. barberi* ( $2n = 81$  a  $2n = 124$ ) como cana da Índia. Estas, também foram cultivadas no passado, entretanto contribuíram com menos genes do que as canas-nobres para cultivares atuais.

Segundo Fauconnier e Bassereau (1975) as espécies não cultivadas são *S. spontaneum* ( $2n = 40$  a  $2n = 128$ ) e *S. robustum* ( $2n = 60$  a  $2n = 205$ ). Apesar do não cultivo de *S. spontaneum*, ela proporcionou, no início do século XX a retomada do crescimento da indústria do açúcar no mundo após as severas epidemias de doenças ocorridas naquela época, sendo considerada uma espécie autopoliplóide, altamente polimórfica (Matsuoka et al., 1999a) e, as principais contribuições dessa espécie para o melhoramento da cana-de-açúcar foram o vigor, o perfilhamento, a capacidade de rebrota da soqueira, a tolerância aos estresses, às pragas e doenças. Existem plantas pequenas e outras com mais de 5m de altura, com diâmetro de colmos variando de três a 15 mm. Em resumo, pode-se dizer que a rusticidade dos cultivares atuais é devida, principalmente, aos genes provenientes de *S. spontaneum*.

De acordo com Roach e Daniels (1987), o primeiro ancestral da cana-de-açúcar *S. robustum* ( $2n = 60$  a  $2n = 205$ ) com  $2n = 80$  ocorreu em Nova Guiné, principal centro primário de diversidade dos clones *S. officinarum*, com 80 cromossomos, donde se supõe que *S. robustum* originou *S. officinarum*. Segundo Peixoto (1986), o primeiro cruzamento interespecífico realizou-se em Java no ano de 1893, mas o êxito com esta metodologia só foi obtido em 1921, também em Java, com a variedade produtiva POJ2878, encontrada na genealogia da maioria das variedades comerciais cultivadas atualmente.

*S. edule* ( $2n = 60$  a  $2n = 80$ ) é uma espécie que possui uma inflorescência comestível e tem sido cultivada em jardins da Nova Guiné e Ilhas Fiji, sendo a única espécie que não contribui com genes para os genótipos cultivados (Clements, 1980).

Morfologicamente, a cana-de-açúcar apresenta colmos compostos de nós e de entrenós. Em cada nó há uma gema que é disposta alternadamente em torno do colmo. Estas são protegidas pela bainha das folhas, que é firmemente

presa ao internódio. As folhas são alternadas, opostas e presas aos nós dos colmos. A parte superior da folha é conhecida como lâmina, e a parte inferior que envolve o colmo, é denominada de bainha. Possui três tipos básicos de raízes: superficiais, de fixação e de cordão. A inflorescência é composta por flores hermafroditas; o ovário é oval com dois pistilos na extremidade que terminam em estigmas plumosos, de cor roxa ou avermelhada, e apenas um óvulo; o órgão masculino é constituído por três estames formados por filamentos brancos e finos, onde cada estame sustenta uma antera linear fixa pelo dorso. Os grãos de pólen são esféricos, quando férteis, e prismáticos quando inférteis, e o fruto da cana-de-açúcar é uma cariópse elíptica alongada (Corte-Brilho et al., 1981; Bacchi, 1985).

## **2.2 Outros aspectos relacionados com a cana-de-açúcar**

A cana-de-açúcar é cultivada em cerca de 70 países e territórios, numa ampla faixa, desde 35°N a 30°S, predominando em áreas subtropicais entre 15 e 30° de latitude e, em altitudes que variam de zero a 1.000 m (Magalhães, 1987). Esta cultura é importante em vários países do mundo, por ser cultivada como matéria-prima, fornecida para a extração do seu caldo na indústria, com a finalidade de produzir açúcar, álcool, fermento, proteína, e inúmeros outros produtos derivados tanto para utilidades alimentícias, como para a indústria química.

O setor sucroalcooleiro brasileiro é o mais competitivo em termos internacionais, por apresentar o melhor desempenho quanto às relações entre rendimentos, produtividade e custos de produção, e, o grande indutor desse desenvolvimento foi a expansão que o setor experimentou nos últimos 20 anos, como decorrência do aumento da produção do álcool e, depois, da produção do açúcar e, mais recentemente, focada no máximo aproveitamento da cana-de-açúcar (Olivério, 2002). Esta cultura apresenta-se como uma das principais atividades agrícolas do Brasil, considerado maior produtor mundial, seguido pela Índia, Cuba, México, China, Filipinas, Austrália, África do Sul, Estados Unidos, dentre outros (Lucchesi, 1995; Matsuoka et al., 1999b; Machado Jr., 2001), assumindo essa liderança na produção desde meados da década de oitenta (Lopes, 1985), sendo responsável atualmente por mais de 25% da produção mundial.

O Brasil, devido a sua extensão territorial, apresenta as mais variadas condições e restrições climáticas e possivelmente é o único país com duas épocas de colheita anuais: de agosto a março no norte-nordeste e de abril a dezembro no centro-sul correspondendo às épocas secas nessas regiões (Alfonsi et al., 1987).

### **2.3 Importância e melhoramento da cana-de-açúcar**

Desde que a cana-de-açúcar foi introduzida no Brasil, esta cultura tornou-se relevante nas atividades agrícolas, tornando-se uma cultura de elevada expressão sócio-econômica, principalmente após a implantação do PROÁLCOOL, que visava substituir parcela do consumo de derivados de petróleo pelo álcool, aumentando, significativamente, a produção com expansão da fronteira agrícola em todo o país (Ruas, 1984; Andrade, 1985), apesar de não se esperar ganhos de produtividade ou de eficiência (Fernandes, 1996). Entretanto, nesse período, o setor pesquisou, desenvolveu, adaptou e implantou moderna tecnologia agrícola e industrial, conduzindo a ganhos significativos de produtividade, o que conduziu o Brasil a liderar na produção mundial de cana-de-açúcar.

As variedades comerciais têm ciclos de degenerescência e é acompanhada de significativas perdas em produtividade agrícola e, por este motivo, elas precisam ser gradativamente substituídas por novos materiais mais estáveis e geneticamente superiores. A degenerescência pode ser atribuída a vários fatores, sendo os principais: queda de produtividade, efeito cumulativo de moléstias, pragas e existência de moléstia sem sintomas visíveis ou ainda não identificadas (Fernandes, 1984).

O melhoramento da cultura tem possibilitado constantes incrementos de rentabilidade, gerando riquezas e aumentando divisas. Os ganhos de produtividade em decorrência da introdução de novas variedades com elevados teores de sacarose e seus manejos com relação aos demais fatores de produção, são creditados às mudanças tecnológicas ocorridas nas últimas duas décadas (Lima e Barbosa, 1996). A variedade melhorada é um fator importante no sistema produtivo, pois, uma vez que manejada de forma adequada, possibilita rendimento industrial, no mínimo, 30% a mais em relação às variedades anteriormente cultivadas (Matsuoka et al., 1999a).

Segundo Barbosa et al. (2003), atualmente genótipos altamente promissores são liberados para plantio comercial com produtividade semelhante ou com pequena superioridade de até 5% em ATR, em relação às principais variedades cultivadas. Todavia, no atual contexto do melhoramento com cana-de-açúcar, estes incrementos na produtividade está se tornando cada vez mais difíceis de serem atingidos quando comparados aos avanços obtidos pelos programas pioneiros no início do século passado (Barreto, 2004). Daí a importância de se utilizar critérios científicos na tomada de decisão pelos pesquisadores, de forma a elevar a eficiência de todo processo seletivo (Barbosa, 1999).

Há diversas iniciativas no sentido de se obter incrementos nas características de interesse dos novos genótipos que passarão a ser cultivados comercialmente que, após sucessivas seleções de experimentação passarão a ser novas variedades. No início dos trabalhos de melhoramento (final do século XIX e início do século XX), foram realizadas numerosas coletas nos centros de diversidade, tanto para utilização direta como cultivar comercial, quanto para se utilizar em cruzamentos dirigidos, por apresentarem características desejáveis (Matsuoka et al., 1999b).

Para isso, os programas de melhoramento vêm utilizando metodologias bastante variáveis (Skinner et al., 1987; Cox e Hogarth, 1993), em que cada programa estabelece alternativas no sentido de se conduzir com êxito o processo seletivo com base nos recursos disponíveis e baseados no sistema de produção do setor. Os programas são dinâmicos, melhorando a eficiência da seleção pela adoção de novas metodologias e/ou aperfeiçoamento daquelas já existentes (James, 1971; Kang et al., 1983; Copersucar, 1997; Hogarth et al., 1997).

Atualmente, há quatro programas de melhoramento genético em cana-de-açúcar no Brasil. Três possuem bancos de germoplasmas: Instituto agrônomo de Campinas, com sigla IAC; Copersucar, sigla SP, com germoplasma situado Camamu-BA; Ridesa, variedades de sigla RB, com germoplasma em Murici-Alagoas e Canavialis S.A., que produzirá variedades com sigla CV, cujo germoplasma encontra-se situado também em Alagoas, no município de Maceió.

Apesar de reconhecida importância e ampla utilização da cana-de-açúcar, ainda persiste uma carência de informações sobre diversos aspectos, sobretudo, estudos envolvendo divergência genética, tendo em vista um melhor

planejamento para o direcionamento de cruzamentos em programas de melhoramento genéticos com esta cultura.

## **2.4 Uso de técnicas multivariadas**

Segundo Hair Jr. et al. (2005) a adoção dos métodos de análise multivariada predominará no futuro e resultarão em drásticas mudanças na maneira como os profissionais de pesquisa pensam em problemas e planejam sua pesquisa, tornando possível solucionar questões de considerável complexidade.

Mingoti (2005) enfatiza que os métodos de estatística multivariada são utilizados para simplificar ou facilitar a interpretação do fenômeno que está sendo estudado através da construção de índices ou variáveis alternativas que sintetizem a informação original dos dados.

A utilização de técnicas multivariadas permite aos melhoristas a identificação de genótipos mais promissores por levar em consideração a contribuição e importância relativa das características para o total da variância existente entre as populações (Barreto, 2004). Estas técnicas permitem avaliar as informações contidas na unidade experimental possibilitando a seleção com base num complexo de variáveis, permitindo selecionar genótipos e/ou progenitores mais promissores (Amaral Jr., 1994). Segundo este autor, trata-se de uma técnica com processo alternativo na avaliação do grau de similaridade entre acessos, que leva em consideração tanto a matriz de covariância residual quanto a de covariância entre médias fenotípicas dos caracteres avaliados.

Em programas de melhoramento genético, principalmente envolvendo cana-de-açúcar, são avaliados diversos caracteres cuja seleção dos materiais (clones, variedades, linhagens) é fundamentada num conjunto de características de maior interesse obtida na herança. Esta prática muitas vezes pode gerar dificuldades para o melhorista, principalmente, quando alguns caracteres apresentam dificuldades na avaliação. Nesse aspecto, são necessárias avaliações e interpretações simultâneas de um conjunto de caracteres para a determinação daqueles que efetivamente contribuem na discriminação genotípica, (Cruz, 1990; Viana, 1990).

Assim, uma maneira de se aumentar a chance de êxito de um programa de melhoramento, é a utilização da seleção simultânea de um conjunto de caracteres econômicos, agrônômicos e fisiológicos (Cruz e Regazzi, 2001). Nesta e em outras oportunidades, a utilização das técnicas de análise multivariada apresenta-se como uma solução, uma vez que elas consideram, simultaneamente, todo conjunto de descritores avaliados. Nesse contexto, esta técnica viabiliza a condução de pesquisas importantes e a avaliação dos efeitos de variações paramétricas que ocorrem no contexto em que elas normalmente ocorrem (Hair Jr. et al., 2005).

De acordo com Soares (1991), a seleção com base em um ou em poucos caracteres pode conduzir a recomendação de cultivares não desejáveis, sobre outros vários caracteres não considerados, o que pode ter como consequência a rejeição do material selecionado.

O objetivo maior de uma análise multivariada é conseguir alguma compreensão a respeito da estrutura e das características dos dados (Marriott, 1974). Cruz (1990) cita que as aplicações das técnicas multivariadas proporcionam enriquecimento das informações disponíveis e maior capacidade de discriminação genotípica, permitindo melhor identificação das unidades seletivas, em termos de maximização de ganhos de eficiência em predições genéticas.

Finney (1956) sugere que a importância da análise multivariada na interpretação de dados deve ser cuidadosamente examinada sob o aspecto prático. Cada situação necessita de diferentes tipos de análise, e torna-se importante conhecer quais questões deverão ser respondidas e que metodologia utilizar.

As técnicas multivariadas têm oferecido contribuições bastante significativas no melhoramento de várias culturas, especialmente em cana-de-açúcar, uma vez que a seleção dos genótipos leva em consideração diversas características nas várias fases de seleção e segundo Souza e Sorrells (1991a) as genéticas podem ser estimadas por meio de caracteres de interesse agrônômico, as quais podem ser observadas através de dendrogramas, em grupos de similaridade ou dissimilaridade genética.

Dentre as técnicas multivariadas utilizadas na determinação da divergência genética, a Distância Generalizada de Mahalanobis ( $D_{ii}^2$ ) utilizando a análise de agrupamento pelo método de Tocher tem sido bastante empregada.

Outra técnica multivariada que tem sido também bastante aplicada no melhoramento é a análise por Componentes Principais, por possibilitar a identificação dos caracteres mais e menos representativos para explicar a variância total, bem como a análise de divergência genética. Esta técnica consiste na transformação de um conjunto original de  $n$  variáveis por outro conjunto equivalente, dotado de propriedades de grande interesse em alguns estudos de melhoramento. Uma das vantagens desta técnica utilizada pelos melhoristas é a identificação de descritores que contribuem mais ou menos para a divergência genética, fazendo com que a adoção desta técnica tenha bastante êxito.

## **2.5 Caracterização e divergência genética: considerações gerais**

A devida caracterização dos genótipos em bancos de germoplasmas para uso seguro nos programas de alargamento da base genética, e o estabelecimento de descritores uniformes das características agroindustriais ficarão mais seguros com o avanço das técnicas biotecnológicas (Matsuoka et al., 1999b), principalmente o uso de marcadores moleculares, técnica que tem se tornado cada vez mais freqüente na caracterização da divergência de genótipos, permitindo direcionar com maior segurança as hibridações realizadas.

O conhecimento do grau de divergência genética é de grande importância em programas de melhoramento que envolve hibridações, por fornecer parâmetros para a identificação de progenitores que, quando cruzados, possibilitam maior efeito heterótico na progênie e maior possibilidade de recuperar genótipos superiores nas gerações segregantes (Jatasra e Paroda, 1983; Soares, 1991; Santos et al., 1994; Samal e Jagadev, 1996; Pandey e Dobhal, 1997; Cruz et al., 2004). A técnica de divergência tem sido utilizada pelos melhoristas de plantas há várias décadas principalmente para investigar a natureza e suas relações de divergência genética envolvendo caracteres morfoagronômicos e moleculares, parentesco, diversidade de origem geográfica, capacidade de

combinação e heterose (Punia et al., 1982; Raveedran e Appadurai, 1984; Behl et al. 1985; Viana, 1990; Pires, 1993; Melo et al., 2001).

O agrupamento e a avaliação de material genético por meio da diversidade genética, com base em evidências científicas, são importantes para o conhecimento da evolução da espécie e para a localização e o intercâmbio de recursos genéticos (Wilches, 1983).

Apesar de a cana-de-açúcar ser uma espécie poliplóide, com número bastante variável de cromossomos nas células somáticas dos híbridos comerciais, sua estreita base genética decorrente da existência de um número restrito de ancestrais comuns em genealogias das variedades tem determinado um grau elevado de endogamia entre genótipos, devido ao inter cruzamento de indivíduos aparentados, ocasionando significativa redução da variabilidade genética, havendo, portanto, grande preocupação em realizar uma escolha criteriosa dos cultivares a serem cruzados, para que o êxito do programa não seja comprometido. Nesta escolha, tem-se dado ênfase tanto ao comportamento “per se” dos genótipos, quanto às suas divergências genéticas. Daí a grande importância que se tem atribuído aos estudos sobre divergência genética nos programas de melhoramentos que envolvem hibridações.

Há várias formas de se avaliar a divergência genética entre populações. Miranda et al. (1988) mostram duas formas básicas: uma de natureza quantitativa, e a outra de natureza preditiva. Entre os métodos de natureza quantitativa, ou da heterose manifestada nos híbridos, citam-se os de análises dialélicas. Nestes métodos, é necessária a avaliação de  $p$  genitores e de todas as suas combinações híbridas  $[p(p - 1) / 2]$ . Obviamente, quando o valor de  $p$  é elevado, a obtenção do material experimentado pode ser impraticável e torna problema mais agravante quando se trata de culturas autógamas, pois nestes casos a polinização manual é, na maioria das vezes, onerosa, difícil de ser executada e com pouca probabilidade de êxito na obtenção da semente híbrida.

Entre os métodos preditivos de heteroses, Miranda et al. (1988) citam os que relacionam a divergência das características dos progenitores com o desempenho dos híbridos. Os métodos preditivos são os que levam em consideração, entre outras, as características agronômicas, fisiológicas, genéticas e morfológicas, apresentadas pelos progenitores na determinação da divergência (Singh et al., 1981; Cruz, 1990; Rodrigues et al., 2002; Rego, et al., 2005; Silva et

al., 2005), que é, geralmente, quantificada pela estatística multivariada, distância euclidiana ou distância generalizada de Mahalanobis. A interferência da divergência genética com base na diferença geográfica também é exemplo de métodos preditivos da heterose.

No estudo da divergência genética, vários métodos multivariados podem ser aplicados. Entre eles, citam-se a análise por componentes principais, por variáveis canônicas e os métodos aglomerativos. A escolha do método mais adequado tem por base a precisão desejada a facilidade da análise e da forma como os dados foram obtidos (Cruz e Regazzi, 2001). Os métodos aglomerativos diferem dos demais, em razão de dependerem fundamentalmente de medidas de dissimilaridade, estimadas, previamente, como as distâncias Euclidianas e de Mahalanobis, entre outras. Já no método dos componentes principais e, também na análise por variáveis canônicas, o objetivo é avaliar a similaridade dos indivíduos por meio de uma dispersão gráfica, em que se consideram, em geral, dois eixos cartesianos (Soares, 1991).

### **2.5.1 Divergência genética estimada através da caracterização agronômica**

Dos três pontos básicos da evolução de qualquer espécie, a variabilidade genética assume um papel fundamental em relação ao progresso genético (Stebbins, 1971). A ausência de variabilidade genética implica diretamente a inviabilidade do progresso genético e, como consequência, restringe a utilização de outros dois componentes evolutivos, que são a seleção e o ajustamento das constituições genéticas aos diferentes ambientes disponíveis (Allard, 1971).

Desta forma, a avaliação da variabilidade genética em um programa de melhoramento é o ponto de partida para o progresso genético. Esta variabilidade pode ser investigada através da caracterização agronômica, ou seja, da descrição de características específicas da cultura.

Trabalhos utilizando caracteres morfológicos têm sido realizados em inúmeras espécies agrícolas. Rodrigues et al. (2002) encontraram divergência genética entre 37 cultivares locais de feijão, o que sugere a importância da sua inclusão em programas de melhoramento. Ritschel e Huamán (2002) avaliaram 324 acessos nativos de batata-doce e identificaram 256 tipos morfológicos.

Outros trabalhos com aveia (Souza e Sorrells, 1991a; Souza e Sorrells, 1991b), caupi (Lopes et al., 2001) e albizia (Rego et al., 2005) têm utilizado esta técnica para diferentes propósitos.

Em cana-de-açúcar Viana (1990) encontrou considerável divergência genética entre 20 clones de cana-de-açúcar estudados aplicando a análise de agrupamento por meio da distância generalizada de Mahalanobis e método e otimização de Tocher. Silva et al. (2005) também aplicou estas técnicas em 129 clones de cana-de-açúcar. Os resultados pelo método de Tocher e pela dispersão gráfica mostraram clones bem dissimilares.

Pires (1993) em estudo para a quantificar a diversidade genética através de caracteres agroindustriais de 29 variedades comerciais cana-de-açúcar, as quais representavam cerca de 90% da área cultivada no Brasil, verificou que as variedades estudadas tiveram restrita base genética. Barbosa (1999) também empregou estudo de diversidade genética em variedades cultivadas no Brasil, observou grupos bem distintos e sugeriu que os genótipos avaliados fossem mais explorados em hibridações pelos programas de melhoramento genético da cultura, recomendando inclusive, cruzamentos com os genótipos divergentes entre e dentro dos grupos formados.

Silva et al. (2002) fazendo-se uso de técnicas de análise multivariada para quantificar o grau de similaridade genética entre 129 clones de cana-de-açúcar no Estado do Paraná, indicaram as características massa média do colmo e massa dos colmos como as de menor contribuição na identificação de parentais produtivos e divergentes. Características consideradas como dispensáveis em estudos de diversidade genética são relativamente invariantes entre as variedades avaliadas e/ou explicadas por outros caracteres (Barreto, 2004). Segundo Santos et al. (1995), o descarte destas características propicia considerável redução de mão-de-obra, menor tempo e custo na avaliação. As características como BRIX refratométrico, número de colmos, massa dos colmos, índices de florescimento, largura e comprimento de folhas, são variáveis normalmente utilizadas para a determinação da divergência genética e também utilizadas para identificar combinações promissoras de maior efeito heterótico nos cruzamentos realizados, com boas possibilidades de elevar o potencial genético nas combinações realizadas, aumentando as chances de se obter novas variedades de cana-de-açúcar (Barbosa et al., 2002).

Tai et al. (1995) avaliaram 125 clones de *S. Spontaneum* L. da coleção mundial, USDA - ARS National Clonal Germoplasm Repository, Miami - Flórida e encontraram considerável variabilidade genética entre os genótipos, fazendo-se uso de cinco características morfológicas e quatro relacionadas à composição química do caldo.

### **2.5.2 Variabilidade genética estimada através de marcadores moleculares**

Diversas técnicas de biologia molecular estão disponíveis, atualmente, para detecção de variabilidade genética no DNA, ou seja, para detecção de polimorfismo genético.

Estudos com variabilidade genética e relações filogenéticas entre diversas espécies vegetais de importância agrônômica têm merecido atenção cada vez maior, principalmente com o recente advento dos marcadores moleculares (Duarte et al., 1999), cujo interesse maior nesses trabalhos é agrupar os indivíduos semelhantes, de forma que as maiores diferenças ocorram entre os grupos formados.

Um marcador de DNA é tipicamente uma pequena região do DNA mostrando diferença (ou polimorfismo) entre indivíduos. Por exemplo, os marcadores de tipo RFLP "Polimorfismo no Comprimento dos Fragmentos de Restrição" ("Restriction Fragment Length Polymorphism"), um dos grupos mais usados de marcadores moleculares, foi o primeiro a ser desenvolvido (Botstein et al., 1980), e, se baseia essencialmente no corte do DNA genômico por uma ou mais enzimas de restrição, gerando milhares de fragmentos. Outros principais tipos de marcadores são o RAPD "Polimorfismo do DNA Amplificado ao Acaso" ("Random Amplified Polymorphism DNA"), Williams et al., (1990) e SSR "Seqüências Simples Repetidas" ("Simple Sequence Repeats") ou "Microssatélites", que são mais polimórficos e consistem em pequenas seqüências com um a cinco pares de base que se repetem em série de número variável, geralmente de uma dezena a uma centena de vezes (Hamada et al., 1982; Litt e Luty, 1989).

Dentre os marcadores empregados, o RAPD e os SSR têm sido amplamente utilizados em estudos de diversidade genética em plantas e outros organismos. Os marcadores RAPD apresentam natureza dominante, o que pode

ser uma limitação, porém, pode ser compensada pelo grande polimorfismo gerado por um único marcador. Possuem a vantagem de apresentar neutralidade fenotípica, é uma técnica rápida e relativamente fácil, necessita de pequenas quantidades de DNA, é facilmente visualizado em gel de agarose, além de não necessitar do conhecimento prévio da seqüência do DNA alvo (Ferreira e Grattapaglia, 1998). No entanto, os microssatélites são co-dominantes, permitindo identificar heterozigotos dentro da população em estudo, além de apresentar um elevado conteúdo de informação de polimorfismo (PIC) e, por serem muito freqüentes e distribuídos ao acaso, permitem uma completa cobertura de qualquer genoma eucarioto.

O uso de técnicas moleculares para avaliação direta da variação de nucleotídeos, com maior precisão e resolução, tem facilitado à análise e tem sido aplicada para diferentes objetivos, podendo ser utilizados de forma prática em programas de melhoramento genético de plantas (Ferreira e Grattapaglia, 1998; Borém, 2004), tanto na identificação de cultivares, como a certificação da pureza genética de sementes, além de se mostrar como uma importante ferramenta utilizada na proteção legal de novos cultivares. Na caracterização de variedades, os marcadores moleculares complementam as informações morfológicas e agrônômicas, oferecendo informações mais detalhadas sobre sua natureza genética (Amorim, 2002).

Em cana-de-açúcar, a vantagem de se utilizar marcadores moleculares está também na possibilidade da identificação precoce das plantas com maior teor de açúcar, antes mesmo de os genótipos entrarem nos ensaios de competição, acelerando o processo para a obtenção de variedades em menos tempo (Silva, 2001). Este autor enfatiza ainda, que há também a possibilidade de evitar os efeitos ambientais, melhorando a eficiência da seleção, cuja estratégia seria extrair o DNA de plantas jovens, a partir de folhas, e aplicar os marcadores associados aos caracteres de interesse. Assim, só iriam para o campo as plantas que apresentarem o marcador, pois seriam aquelas que, por possuírem os genes favoráveis, deveriam apresentar os caracteres de interesse, resultando em variedades superiores de forma rápida e eficiente.

Diversos trabalhos foram publicados sobre a avaliação de polimorfismo com marcadores moleculares em várias espécies vegetais (Smith e Senior, 2000;

Souza, 2002; Vidor et al., 2002; Hudcovicová e Kraic, 2003; Ruas et al., 2003; Collares et al., 2004; Schäfer et al., 2004; Silva et al. 2005; Kulcheski et al., 2006).

Em cana-de-açúcar Selvi et al. (2005) realizaram a caracterização genética de 28 cultivares comerciais de cana-de-açúcar cultivados nas regiões tropicais e subtropicais da Índia através de AFLP. Verificaram que onze primers selecionados nesse estudo foram, suficientes para separar todos os cultivares individualmente e sugeriram sua utilidade na identificação de cultivares de cana-de-açúcar. Observaram também que a diversidade genética entre as cultivares tropical e subtropical foi muito mais elevada que as medidas de diversidade dentro de cada uma das regiões destes dois grupos adaptáveis. Os autores constataram ainda que o agrupamento dos cultivares também correspondeu bem com as relações de suas genealogias.

Lima et al. (2002) utilizaram AFLP e dados de genealogia de cana-de-açúcar para investigar a relação genética em um grupo de 79 cultivares e quatro espécies de *Saccharum*, obtiveram uma correlação estatisticamente significativa ( $r=0,42$ ,  $P<0,001$ ), sugerindo que os dados de AFLP podem ajudar na quantificação do grau de relação com maior precisão entre cultivares de cana-de-açúcar.

Matsuoka et al. (2005) utilizaram SSR para a caracterização de 32 clones de cana-de-açúcar e verificaram que os marcadores polimórficos permitiram identificar a maioria dos genótipos avaliados. Eles enfatizaram que estes tipos de marcadores podem ser utilizados de forma rápida na identificação de clones de cana-de-açúcar.

Queme et al. (2005) também utilizaram SSR a partir de seis pares de iniciadores em 48 variedades de cana-de-açúcar. Através do coeficiente de Dice, obtiveram variação entre cada par de genótipos de 0 a 0,52, com uma média de 0,11, o qual indicou a existência de variabilidade genética.

Quirino (2003) investigou a existência de polimorfismos de seqüência nucleotídica SNPs ("single nucleotide polymorphisms") em fragmentos genômicos

de cana-de-açúcar homólogos a genes de resistência. A comparação de seqüências entre variedades possibilitou a identificação de quatro a seis fragmentos distintos e concluiu que a utilização de SNPs como marcadores moleculares baseados em PCR, em cana-de-açúcar, mostra-se mais complexa quando comparada a plantas diplóides.

A utilização de marcadores moleculares em cana-de-açúcar também tem sido empregada com outros propósitos. Zucchi et al. (1996) usaram RAPD para estudar variação somaclonal na variedade RB835486 e concluíram que as variações em função do polimorfismo observado foram de natureza genética.

## **3 METODOLOGIA**

---

### **3.1 Genótipos estudados**

Os genótipos utilizados para avaliação dos caracteres morfoagronômicos, assim como para a caracterização molecular foram: RB72454, SP79-1011, RB92579, RB93509, RB931530, RB931003, RB931011, RB931611, RB9364, RB94503, RB951541, RB961.

### **3.2 Condução do experimento para avaliação dos caracteres morfoagronômicos**

Para obtenção dessas características, foi conduzido um experimento na área comercial do campo experimental da Usina Santa Clotilde, situada no município de Rio Largo, Alagoas, em parceria com o Programa de Melhoramento Genético da Cana-de-açúcar (PMGCA), no delineamento em blocos casualizados com 12 tratamentos e quatro repetições, com parcelas constituídas de cinco sulcos de 10 metros de comprimento, espaçamento de 1,0 metro entre sulcos, densidade de 15 gemas por metro linear. O solo foi caracterizado como Latossolo Podzólico Vermelho-Amarelo, de topografia plana, cujo preparo para a instalação do experimento seguiu as técnicas tradicionais para a cultura da cana-de-açúcar, envolvendo aração, gradagem e aplicação de NPK com base em

recomendação técnica conforme análise de solo. Também foi efetuado o controle de pragas e plantas daninhas, bem como a irrigação para suprir as necessidades hídricas da cultura e proporcionar seu bom desenvolvimento.

### 3.3 Variabilidade genética a partir de características quantitativas

#### 3.3.1 Características quantitativas estudadas

Para os caracteres quantitativos, foram avaliadas 13 características, obtidas na área útil de cada parcela, correspondente às três fileiras centrais no estádio de cana-planta, cujas características são apresentadas no Quadro 1.

**Tabela 1.** Caracteres quantitativos de cana-de-açúcar avaliados com 10 meses: DMC, NEC, AC, NF, AIF, NCP, NCT e NTP; TCH, FIBRA, BRUX, POL e AR, obtidos com 14 meses, 2005/2006.

Caracteres	Descrição
1. Diâmetro Médio do Colmo (DMC)	Obtida do centro do entrenó do colmo localizado a uma altura de 40 cm do solo, através de um paquímetro.
2. Número de Entrenós por Colmo (NEC)	Este caráter foi obtido pela contagem do número de entrenós formado, iniciando a partir da base para o ápice, descartando-se o palmito. Avaliou-se em quatro colmos de touceiras competitivas da fileira central da parcela.
3. Altura do Colmo (AC)	Medida da base do colmo até o último entrenó, com uma trena de 3,0 m através de medições em quatro colmos de cada parcela, com o auxílio de uma trena.
4. Número de Folhas (NF)	Esta característica foi obtida pela contagem de folhas totalmente desenvolvidas e apresentando aurícula visível e 80% da superfície da folha verde.
5. Ângulo de Inserção da Folha (AIF)	Mediu-se o ângulo de inserção, em graus, tomando como folha padrão +3, seguindo a classificação de Dillewijn (1952), tomando-se o início a partir do dew-lap como zero grau, utilizou-se nesta avaliação um transferidor.
6. Número de Colmos por Parcela (NCP)	Caráter obtido através da contagem dos colmos formados e desenvolvidos nas fileiras da área útil de cada parcela.
7. Número de Touceiras por Parcela (NTP)	Característica obtida pela contagem do número de touceiras formadas e definidas, por um conjunto de colmos do mesmo perfilho de origem.
8. Número de Colmos por Touceira (NCT)	Obtida pela relação NCP/NTP

**Tabela 1.** (Cont.) Caracteres quantitativos de cana-de-açúcar avaliados com 10 meses: DMC, NEC, AC, NF, AIF, NCP, NCT e NTP; TCH, FIBRA, BRIX, POL e AR, obtidos com 14 meses, 2005/2006.

<b>Caracteres</b>	<b>Descrição</b>
9. Tonelada de Cana por Hectare (TCH)	Para obtenção desta característica, pesaram-se todos os colmos de cada parcela, convertendo-os para TCH.
10. FIBRA (Percentagem de matéria seca insolúvel em água)	
11. BRIX % (Percentagem de sólidos solúveis totais no caldo)	Amostras de 10 canas por parcela realizada em laboratório.
12. POL% cana (Percentagem de sacarose aparente contida na cana)	
13. AR (Açúcares Redutores: glicose e frutose)	

### 3.3.2 Análise dos caracteres quantitativos

Os dados foram submetidos à análise de variância univariada, pela qual foram obtidas as médias e as matrizes de variâncias e covariâncias residuais, sendo as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott (1974), visto que este é um método utilizado como uma alternativa em procedimentos de comparação múltipla, por não apresentar ambigüidade nos resultados (Silva et al., 1999).

#### 3.3.2.1 Medidas de divergência genética utilizadas

A quantificação da divergência genética a partir de caracteres quantitativos foi realizada através da Distância Generalizada  $D_{ii}^2$  de Mahalanobis, da Distância Euclidiana Média Padronizada e da análise por Componentes Principais. Para o estudo envolvendo essas três técnicas, de divergência, as variáveis consideradas foram TCH, POL, AR e FIBRA, uma vez que são caracteres de grande interesse agrônomo em estudos com melhoramento de cana-de-açúcar.

O agrupamento dos genótipos estudados foi realizado através do método UPGMA (“*modelo hierárquico aglomerativo da média aritmética entre pares não ponderados*”) e a análise aglomerativa pela técnica do método hierárquico do “Vizinho mais Distante”, utilizando-se como medidas de dissimilaridade a Distância Euclidiana Média Padronizada e a Distância Generalizada  $D_{II}^2$  de Mahalanobis. Para Distância  $D_{II}^2$ , utilizou-se adicionalmente o agrupamento pelo método de otimização de Tocher, a fim de comparar seu relacionamento quanto a formação dos grupos em relação às duas técnicas de agrupamentos utilizadas com base nas distâncias obtidas, como também para os grupos formados a partir da técnica por Componentes Principais.

### 3.3.2.2 Distância Euclidiana Média Padronizada

A Distância Euclidiana Média Padronizada como medida de dissimilaridade que considera a matriz  $[X_{ij}]_{n \times p}$  de dados é representada matricialmente por:

$$X = \begin{bmatrix} X_{11} & X_{12} & X_{13} & \dots & X_{1p} \\ X_{21} & X_{22} & X_{23} & \dots & X_{2p} \\ X_{31} & X_{32} & X_{33} & \dots & X_{3p} \\ \vdots & \vdots & \vdots & & \vdots \\ X_{n1} & X_{n2} & X_{n3} & \dots & X_{np} \end{bmatrix}_{(n \times p)}$$

Em que:

n = número de genótipos em estudo;

p = número de caracteres avaliados;

Dessa forma, cada vetor linha representa uma unidade amostral (genótipo) e cada vetor coluna uma variável (característica).

A padronização é realizada para eliminar os efeitos da mudança de escala das características avaliadas, obtida através da expressão:

$$Z_{ij} = \frac{X_{ij} - \bar{X}_j}{s_j}$$

Onde:

$Z_{ij}$  = é o valor padronizado da observação  $X_{ij}$  no i-ésimo genótipo ( $i = 1, 2, \dots, n$ ) e j-ésima característica ( $j = 1, 2, \dots, p$ ).

$\bar{X}_j$  = média dos dados da característica j;

$s_j$  = desvio padrão dos dados da característica j.

A Distância Euclidiana Média baseada em dados padronizados entre dois genótipos i e i' foi obtida pela seguinte expressão (Cruz e Regazzi, 2001):

$$D_{ii'} = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_j (x_{ij} - x_{i'j})^2},$$

Em que n = número de características analisadas.

### 3.3.2.3 Distância Generalizada $D_{ii'}^2$ de Mahalanobis

A Distância Generalizada  $D_{ii'}^2$  de Mahalanobis entre dois genótipos é calculada de acordo com a fórmula definida por Mahalanobis (1936) e apresentada por RAO (1952), sendo adequada para dados provindos de repetições em ensaios experimentais. De posse das informações, são estimadas as médias  $X_{ij}$  para cada tratamento e a matriz n x n de dispersão residual entre os caracteres, ou matriz de variâncias e covariâncias residuais, as estimativas de  $D_{ii'}^2$  são obtidas pela expressão:

$$D_{ii'}^2 = \delta' \psi^{-1} \delta$$

Em que:

$D_{ii'}^2$  = distância de Mahalanobis entre os genótipos i e i';

$\psi$  = matriz de variâncias e covariâncias residuais;

$\delta' = [d_1 \ d_2 \ \dots \ d_n]$ , sendo  $d_n = Y_{ij} - Y_{i'j}$ ;

$d_n$  = representa a diferença entre médias de dois genótipos i e i' para uma dada característica j.

$Y_{ij}$  = média do i-ésimo genótipo em relação à j-ésima variável.

No presente trabalho as estimativas de  $D_{ii'}^2$  foram obtidas por meio de variáveis transformadas, em que se combinam as variáveis originais, cujas variâncias e covariâncias residuais são iguais a 1 e 0, respectivamente. Para a obtenção deste conjunto de variáveis não-correlacionadas  $Z_r$  ( $r = 1, 2, \dots, p$ ), a partir do conjunto de variáveis originais  $X_r$ , utilizou-se a técnica de inversão por

condensação pivotal, da matriz de dispersão residual  $\psi$ . Com essa técnica, a matriz de dispersão residual foi reduzida a uma matriz identidade  $I$ , obtendo-se a

distância  $D_{ii'}^2$ , por meio da expressão:  $D_{ii'}^2 = \sum_{r=1}^p (Z_{ir} - Z_{i'r})^2$ , em que:

$Z_{ir}$  = média da  $r$ -ésima variável transformada pelo processo de condensação pivotal.

Com a matriz de dissimilaridade da Distância Generalizada de Mahalanobis, é inicialmente identificado o par de cruzamentos  $ii'$ , que apresenta o menor valor de distância, formando assim o primeiro grupo. Em seguida, avalia-se a possibilidade de incluir mais um genótipo no grupo ou a necessidade de formação de outros grupos, obedecendo-se o mesmo critério anteriormente citado.

A distância média intragrupo é dada por:  $\sum_{ij'=1}^k \frac{D_{ii'}^2}{C_n^2}$ ,

Em que:

$\sum_{ij'=1}^k D_{ii'}^2$  = soma de todas as possíveis combinações dos  $n$  genótipos incluídos no grupo; e  $C_n^2$  = número máximo de combinações dois a dois dos  $n$  genótipos incluídos no grupo.

As distâncias médias intergrupos são calculadas somando-se as distâncias de todos os possíveis pares de genótipos entre dois grupos; esse valor é então dividido pelo número de pares formados.

### 3.3.2.4 Análise da divergência por Componentes Principais

A análise de Componentes Principais foi realizada conforme detalhamento e considerações gerais segundo Cruz et al. (2004). Dessa forma, os componentes principais foram obtidos da seguinte forma: seja  $X_{ij}$  média padronizada do  $j$ -ésimo caráter ( $j= 1, 2, 3, 4$ ) avaliado do  $i$ -ésimo genótipo ( $i= 1, 2, 3, \dots, 12$ ) e  $R$  a matriz de variância e covariância fenotípica entre os caracteres.

O método consiste em transformar conjunto de  $n$  variáveis ( $X_{i1}, X_{i2}, \dots, X_{in}$ ) em um novo conjunto ( $Y_{i1}, Y_{i2}, \dots, Y_{in}$ ), em que  $Y'_j$ s são funções lineares dos  $x'_j$ s

independentes entre si, ou seja não correlacionados, conforme as seguintes propriedades:

Se  $Y_{ij}$  é um componente principal, então:

$$Y_{ij} = a_1x_{i1} + a_2x_{i2} + \dots + a_nx_{in} \quad (1)$$

Se  $Y_{ij}$  é um componente principal, então:

$$Y_{ij} = b_1x_{i1} + b_2x_{i2} + \dots + b_nx_{in} \quad (2)$$

Onde  $Y_{ij}$  e  $Y_{ij'}$  apresentam as restrições:

$$\sum_j a_j^2 = \sum_j b_j^2 = 1$$

$$\sum_j a_j b_j = 0$$

Assim, dentre todos os componentes principais, a variância decresce da seguinte maneira:

$$Y_{i1} > Y_{i2} > \dots > Y_{in} \quad (3)$$

Desta forma, pode-se estimar:

a) a variância associada a cada componente por meio das raízes características da matriz  $R$ .

Cada raiz característica, ou autovalor ( $\lambda$ ), é obtida considerando-se que:

$$\det (R - \lambda_i I) = 0$$

b) os coeficientes de ponderação de cada componente principal são obtidos por meio de vetores característicos associados a cada raiz característica de  $R$ .

Cada vetor característico, ou autovetor ( $\mathbf{a}$ ), obtido pela solução de:

$$(R - \lambda_i I) \mathbf{a} = \phi$$

c) a ordem das variáveis associadas aos maiores elementos identificados do último até o primeiro autovetor.

As variáveis de maiores pesos nos últimos autovetores foram consideradas de menor importância. Entretanto, as variáveis de maiores pesos nos primeiros autovetores, as de maior importância para a divergência genética.

A disposição relativa dos 12 genótipos foi determinada pela utilização da técnica de dispersão de escores em gráficos tridimensional. O gráfico de dispersão foi construído com base nos escores dos três primeiros componentes em que os genótipos foram transpostos de um espaço n-dimensional ( $n = 8$ ) para um plano tridimensional, utilizando os componentes principais 1, 2 e 3 (CP1 x CP2 x CP3).

d) o conjunto de cargas totais associadas às variáveis, considerando-se que:

$$C_j = a R, \text{ em que,}$$

$C_j$  é o vetor linha de ordem  $j$  cujos elementos são  $C_{kj}$ .

A carga da variável  $k$  no  $j$ -ésimo componente principal pode ser representada da seguinte forma:

$$\text{Carga} = \frac{C_{kj}}{\sqrt{\lambda_j}}$$

Neste caso, considera-se que a correlação entre  $k$ -ésima característica e o  $j$ -ésimo componente pode ser obtido por:

$$r_{kj} = \frac{Cov(x_k, y_j)}{\sqrt{\hat{V}(x_k)\hat{V}(y_j)}}$$

e) A importância relativa (IR) de cada componente é determinada pela expressão:

$$IR_j = \frac{\lambda_j}{\text{Traço}(R)}, \text{ onde,}$$

$\lambda_j$  são raízes características (autovalores) de  $R$ .

Os demais componentes principais são obtidos analogamente ao descrito para os dois primeiros. Em estudos de divergência genética, entre um grupo de genótipos, é desejável que a variância acumulada nos dois primeiros componentes principais exceda 80%, para que a distorção das coordenadas de cada genótipo, no gráfico de dispersão cujos eixos são os componentes principais, seja considerada aceitável e as inferências no estudo da diversidade genética, sejam satisfatórias (Cruz et al., 2004).

### 3.3.3 Diversidade genética a partir dos caracteres morfológicos e por marcadores moleculares

#### 3.3.3.1 Características morfológicas consideradas

Foram avaliadas 31 características morfológicas no presente trabalho, permitindo a construção de uma matriz binária quanto às características em estudo. As características morfológicas avaliadas foram obtidas a partir de algumas medições efetuadas e principalmente, através de observações visuais, em cada parcela (Quadro 2).

**Tabela 2.** Características morfológicas avaliadas em genótipos de cana-de-açúcar, com 10 meses, exceto brotação, perfilhamento e desenvolvimento, que foram avaliadas com dois meses, 2005/2006.

<b>Caracteres morfológicos</b>	<b>Descrição</b>
<b>1. Touceira</b>	
1.1. Hábito de crescimento	Observação visual dos colmos da parcela, com valor (1) para crescimento ereto e (0) para crescimento levemente decumbente.
1.2. Brotação	Observação visual quanto a germinação das plantas 40 dias após o plantio, através de escala de notas em cada parcela. Brotação satisfatória: notas média 2,4 a 3,0 e brotação ótima: média >3,0, com valor (0) para brotação boa e (1) para brotação ótima.
1.3. Desenvolvimento	Observação visual quanto ao tamanho e vigor das plantas dois meses após o plantio, através de escala de notas em cada parcela. Desenvolvimento satisfatório: notas 2,4 a 3,0 e desenvolvimento ótimo: média >3,0, com valor (0) para desenvolvimento bom e (1) para desenvolvimento ótimo.
1.4. Perfilhamento	Contagem da quantidade de plantas em cada touceira da parcela, considerando-se perfilhamento médio: $\leq 5,4$ e perfilhamento ótimo $> 5,4$ , com valor (0) para perfilhamento médio e (1) para perfilhamento ótimo.
<b>2. Colmos</b>	
2.1. Comprimento dos entrenós	Medida na parte mediana dos colmos (situado a uma altura de $\pm 40$ cm do solo). Comprimento curto: $< 15$ cm, médio: de 15 a 20 cm, com valor (0) para comprimento curto e (1) para comprimento médio.
2.2. Diâmetro dos entrenós	Obtida do centro do internódio na altura mediana do colmo, com um paquímetro. Diâmetro fino: $< 2,5$ cm, médio: 2,5 a 3,5 cm, com valor (1) para diâmetro médio e (0) para diâmetro fino.

**Tabela 2.** (Cont.) Características morfológicas avaliadas em genótipos de cana-de-açúcar, com 10 meses, exceto brotação, perfilhamento e desenvolvimento, que foram avaliadas com dois meses, 2005/2006.

<b>Caracteres morfológicos</b>	<b>Descrição</b>
<b>2. Colmos</b>	
2.3. Formato de entrenós	Observação visual dos colmos da parcela, com valor (0) para formato cilíndrico e (1) para formato curvado.
2.4. Tipos de rachaduras nos entrenós	Observação visual dos colmos da parcela, com valor (1) para ausência de rachaduras e (0) para rachaduras rasas.
2.5. Disposição dos entrenós no colmo em ziguezague	Observação visual dos colmos da parcela, com valor (1) para disposição suave e (0) para disposição nítida.
2.6. Aspecto dos entrenós	Observação visual dos entrenós dos colmos da parcela com relação a presença e/ou ausência de manchas, com valor (0) para entrenós lisos e (1) para entrenós manchados.
2.7. Canaleta da gema	Observação visual na base dos internódios (acima do anel de crescimento) dos colmos das plantas da parcela, com valor (0) para ausência de canaleta e (1) para canaleta rasa.
2.8. Quantidade de cera no entrenó	Observação visual dos colmos da parcela, com valor (0) para pouca cera e (1) para muita cera.
2.9. Saliência do anel de crescimento do nó	Observação visual dos anéis de crescimento nos nós dos colmos da parcela, com valor (0) para pouca saliência e (1) para saliência média.
2.10. Cor do primórdio radicular, sob a palha	Observação visual dos primórdios radiculares (após a retirada da palha) da região radicular situada nos nós dos colmos da parcela, com valor (0) para amarelo-verde e (1) para roxo-amarelo.
2.11. Largura da zona radicular do nó	Medida linear em centímetros da região compreendida entre a cicatriz foliar e a base do anel de crescimento do nó, efetuada no lado que se situa a gema e o lado oposto à gema na altura mediana do colmo, com um paquímetro, obtendo-se um valor médio. Largura: estreita: < 0,8 cm, média: de 0,8 a 1,3 cm, com valor (1) para largura estreita e (0) para largura média.
2.12. Enraizamento aéreo na zona radicular do nó	Observação visual de presença e intensidade de raízes aéreas na região radicular situada na parte basal dos colmos na parcela, com valor (1) para ausência de enraizamento e (0) para pouco enraizamento.
<b>3. Gemas</b>	
3.1. Saliência das gemas no nó	Observação visual das gemas em relação ao nó, com valor (1) para pouca saliência e (0) para saliência média.
3.2. Inserção da gema em relação ao anel de crescimento	Observações visuais das gemas se ultrapassam ou não o anel de crescimento, com valor (1) quando nunca ultrapassam e (0) quando ocasionalmente ultrapassam.

**Tabela 2.** (Cont.) Características morfológicas avaliadas em genótipos de cana-de-açúcar, com 10 meses, exceto brotação, perfilhamento e desenvolvimento, que foram avaliadas com dois meses, 2005/2006.

<b>Caracteres morfológicos</b>	<b>Descrição</b>
<b>3. Gemas</b>	
3.3. Posição do poro da gema	Observação visual quanto ao ponto de crescimento da gema, com valor (0) para poro sub-apical e (1) para poro apical.
3.4. Distribuição de pêlos nas gemas	Observação visual com auxílio de uma lupa da ausência ou presença de pêlos nas gemas e sua distribuição em relação à gema, com valor (0) para ausência de pêlos e (1) para presença de pêlos distribuídos no ápice das gemas.
<b>4. Folhas</b>	
4.1. Largura do limbo	Característica analisada em 5 folhas +3 com um paquímetro, medida na parte mediana do limbo, obtendo-se um valor médio. Largura: estreita: <4,0cm, média: de 4,0 a 5,5 cm, com valor (0) para limbo de largura estreita e (1) para limbo com largura média.
4.2. Pêlos no bordo do limbo	Observação visual quanto à presença e intensidade de pêlos no bordo do limbo foliar com auxílio de uma lupa, com valor (0) para ausência de pêlos e (1) para presença de poucos pêlos.
4.3. Serrilhamento do bordo	Observação visual das bordas de 5 folhas +3 quanto à margem de serrilhamento do bordo do limbo foliar, com valor (0) para fraco serrilhamento e (1) para serrilhamento médio.
4.4. Volume da copa foliar	Observação visual do volume da copa foliar na parcela quanto a sua intensidade, com valor (0) para copa foliar rala e (1) para copa foliar regular.
4.5. Tonalidade da copa foliar	Observação visual da tonalidade da copa foliar na parcela, com valor (0) para copa de tonalidade clara e (1) para copa de tonalidade intermediária.
4.6. Tamanho da aurícula	Pequeno apêndice na base das folhas reentrantes na parte inferior. Característica analisada em 5 folhas +3 com um paquímetro, obtendo-se um valor médio. Aurícula pequena: <2,0 cm, aurícula média: de 2,0 a 5,0 cm, com valor (1) para aurícula pequena e (0) para aurícula média.
4.7. Formato do cotovelo "dewlap"	Observação visual quanto ao formato do dewlap, com valor (0) para dewlap com formato normal e (1) para dewlap com formato triangular.
<b>5. Bainha</b>	
5.1. Posição da pilosidade	Observação visual da presença ou ausência de pêlos na bainha, com valor (0) para ausência de pêlos e (1) para presença de pêlos no dorso da bainha.

**Tabela 2.** (Cont.) Características morfológicas avaliadas em genótipos de cana-de-açúcar, com 10 meses, exceto brotação, perfilhamento e desenvolvimento, que foram avaliadas com dois meses, 2005/2006.

<b>Caracteres morfológicos</b>	<b>Descrição</b>
<b>6. Palmito</b>	
6.1. Presença de cera	Observação visual quanto à presença e intensidade de cera no palmito (região compreendida entre o dewlap +1 até a inserção da folha +4 ou +5, com valor (0) para fraca presença de cera e (1) para quantidade regular de cera.
6.2. Comprimento	Medida linear em centímetros de 5 palmitos compreendidos do dewlap +1 até à inserção da folha +4, realizado com o auxílio de uma trena, obtendo-se uma média. Palmito curto: <50 cm, palmito de comprimento médio: 50 a 65 cm. Valor (0) para plantas com palmito de tamanho médio e (1) para palmitos curtos.
6.3. Seção transversal	Observação visual do palmito quanto à sua seção transversal, através de seu corte perpendicular em relação ao seu comprimento, com valor (0) para seção transversal oval e (1) para seção transversal circular.

### 3.3.3.2 Obtenção de DNA para análise molecular

#### 3.3.3.2.1 Execução do trabalho

Para a avaliação da presença de DNA polimórfico, os 12 genótipos conduzidos no experimento nas condições de campo na Usina Santa Clotilde foram plantados em casa de vegetação com a finalidade de se obter folhas jovens para extração e isolamento de DNA. Para isto, os mini-rebolos antes de plantados foram tratados com fungicida Derosal utilizando 1mL/10L de água, com imersão por dois minutos, plantados em caixas contendo substrato na proporção de 1/4 de polpa de coco, 1/4 de torta de filtro e 2/4 de terra preta.

Foram coletadas amostras de folhas frescas dos genótipos cultivados em casa de vegetação e levadas para o Laboratório de Genética Molecular, Genômica e Proteômica (GEMPRO) do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Alagoas (CECA / UFAL), situado no município de Rio Largo, Estado de Alagoas, para extração do DNA genômico total e posteriores análises biomoleculares. Foram colhidas as folhas mais jovens de cada genótipo

no estágio inicial de desenvolvimento, com uma semana após germinação. As amostras coletadas foram conduzidas ao laboratório, lavadas em água destilada e esterilizada, então armazenadas a 4°C até o momento do isolamento de DNA.

### **3.3.3.2 Extração e isolamento do DNA**

Para o isolamento do DNA genômico total foi utilizado protocolo descrito por Graham et al. (1994) utilizando-se o detergente catiônico CTAB 2% (cationic hexadecyl trimethyl ammonium bromide) na composição do tampão de extração.

A quantidade de tecido foliar fresco utilizado para cada genótipo foi de 150 mg, o qual foi macerado (para rompimento das paredes e membranas celulares) dentro de microtubos contendo 500 µL de solução do tampão de extração [2 % (m/v) CTAB, 100 mM Tris-HCl, 1,4 mM NaCl, 20 mM EDTA, pH 8,0]. As amostras depois de homogeneizadas, foram incubadas em banho-maria a 65°C por 30 minutos. Decorrido esse tempo, os tubos foram centrifugados a 11.336 x g por 5 minutos. O sobrenadante foi coletado e transferido para um novo microtubo. Adicionou-se o mesmo volume de CIA (24:1) e, em seguida, os tubos foram invertidos 3 vezes durante 2 minutos para homogeneizar a amostra. Após centrifugar a 12.045 x g por 30 segundos, o sobrenadante foi cuidadosamente coletado e transferido para um novo microtubo. Adicionou-se 1/10 do volume coletado de acetato de amônio 7,5 M e 2 vezes o volume de etanol absoluto gelado (previamente armazenado a -20°C). Os tubos foram delicadamente invertidos para precipitação do DNA e, em seguida, incubados a -20°C por, no mínimo, uma hora. Após centrifugar a 12.045 x g por 90 segundos, o sobrenadante foi descartado. O precipitado de DNA foi então lavado com etanol 70% e os tubos foram invertidos para secar a temperatura ambiente por 20 minutos. O DNA extraído foi ressuspenso em 80 µL de TE [Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM, pH 8,0] e incubado em banho-maria a 37°C por 30 minutos. Após esfriamento a temperatura ambiente, o DNA foi acondicionado a 4°C.

### 3.3.3.2.3 Concentração e pureza do DNA

Depois de obtido, foi realizada a avaliação da qualidade do DNA genômico total isolado. Os resultados foram obtidos em  $\eta\text{g}/\mu\text{L}$  por quantificação em espectrofotômetro JENWAY (Genova Life Science Analyser), considerando-se a leitura da absorbância no comprimento de onda de 260 $\eta\text{m}$ . Ainda, através da leitura em espectrofotômetro, foi determinada a pureza do DNA, obtida pela razão  $\text{OD}_{260} / \text{OD}_{280}$ . Para a determinação da qualidade do DNA, uma alíquota de 5 $\mu\text{L}$  de cada amostra foi analisada por meio de eletroforese em gel de agarose 0,8% (p/v) e submerso em tampão TBE (Tris-borato 89mM, EDTA 2mM), submetido a 3,3 V/cm, durante uma hora. O gel foi posteriormente corado com brometo de etídio contendo 0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  diluído em TBE. O DNA genômico foi visualizado em transiluminador de luz UV e fotodocumentado através do Sistema Digital Kodak Science.

### 3.3.3.2.4 Primers RAPD utilizados e condições da PCR

Onze oligonucleotídeos iniciadores (IDT<sup>®</sup>, Integrated DNA Technologies, Inc) foram testados e todos foram utilizados nas reações RAPD por produzirem padrões consistentes e perfis eletroforéticos variáveis. Os oligonucleotídeos empregados no estudo, encontram-se descritos a seguir na Tabela 3, com suas respectivas seqüências.

**Tabela 3.** Primers RAPD utilizados na análise molecular RAPD dos 12 genótipos de cana-de-açúcar.

PRIMER	SEQUÊNCIA DO INICIADOR (5'→3')	% CG
OPA 1	CAG GCC CTT C	70
OPA 2	TGC CGA GCT G	70
OPA 3	AGT CAG CCA C	60
OPA 4	AAT CGG GCT G	60
OPA 7	GAA ACG GGT G	60
OPA 8	GTG ACG TAG G	60
OPA 9	GGG TAA CGC C	70
OPA 10	GTG ATC GCA G	60
OPA 16	AGC CAG CGA A	60
OPA 18	AGG TGA CCG T	60
OPA 20	GTT GCG ATC C	60

Cada reação de amplificação compreendeu um volume total de 50  $\mu$ L, consistindo de dNTPs Mix 200 $\mu$ M, Tampão PCR 1X (Tris-HCl 50mM, KCl 20 mM), MgCl<sub>2</sub> 2mM, 0,5  $\mu$ M de cada iniciador, 8U de Taq DNA polimerase (Biosystems), 20 ng de DNA genômico, água Milli Q estéril. As amplificações foram conduzidas num termociclador PTC-200 Peltier Thermal Cycler (MJ Research), empregando-se um programa com etapa inicial de pré-desnaturação a 92°C por 4 minutos, seguida de 40 ciclos, com 45 segundos a 92°C, 1 minuto e 30 segundos de pareamento a 40°C, 1 minuto e 30 segundos de extensão a 72°C. Após, foi realizado um ciclo adicional de extensão final de 5 minutos a 72°C.

Os fragmentos amplificados foram resolvidos em gel de agarose 1,5% (p/v), submerso em tampão TBE (Tris-borato 89mM, EDTA 2mM), aplicando-se 3 V/cm durante 5 horas. Foi utilizado padrão de peso molecular de 1Kb (Promega) para análise dos fragmentos. O gel foi posteriormente corado com brometo de etídeo (0,5  $\mu$ g/mL), visualizado sob luz UV e fotodocumentado através do Sistema Digital Kodak Science.

#### **3.3.3.2.5 Primers SSR utilizados e condições das reações de amplificação**

Foram selecionados seis pares de iniciadores que flanqueiam regiões de microssatélites em cana-de-açúcar. Os iniciadores denominados MCS005C04, MCSA175G03, MCSA176C01, MCSA205C07, YCS02.047 e YCS24.043, foram sintetizados pela Dialab Diagnósticos, Brasil. Os iniciadores foram escolhidos pelo polimorfismo apresentado em estudos prévios com cana-de-açúcar. As seqüências dos locos SSR utilizadas neste estudo encontram-se descritos a seguir na Tabela 4.

**Tabela 4.** Primers SSR testados para caracterização dos 12 genótipos de cana-de-açúcar.

Primer	Seqüência (5' → 3')
MCSA175G03	CCATCGAGCAATCGAGCTGC GTTTGACAGGCGGATGTTCTGA
MCSA176C01	GAGTCAGTTGGTGCCGAGATTG CGAACAGGTTAAAGCCCATGTC
MCSA205C07	GCTACCAGCTCTCGGTGCTTC GCACGGGCTAGAACCTAGAAGG
MCS005C04	AGTAGTCACCACCATGTCTGGCA CATCCTCCAAGCATCTGTTCCA
YCS24.043	CCAAAGCCCAACTGAAAGAGC GAGGTTAGCGAAGTGGATCACG
YCS02.047	GCAGAGACAGGCGTCTTCGTACT GCGTTTCCGACCTGGATACC

As reações de amplificação foram realizadas em cada um dos 12 genótipos utilizando iniciadores específicos de cada loco. Inicialmente, cada reação foi realizada em um volume total de 50  $\mu$ L, mesmo volume utilizado para as reações de RAPD, consistindo de dNTPs Mix 200 $\mu$ M, Tampão PCR 1X (Tris-HCl 50mM, KCl 20 mM), MgCl<sub>2</sub> 2mM, 0,5  $\mu$ M de cada iniciador 3' e 5', 8U da enzima Taq DNA-polimerase (Biosystems), 20 ng de DNA genômico, água Milli Q estéril. As concentrações MgCl<sub>2</sub> foram modificadas para 2,5 em algumas reações de PCR dos iniciadores MCSA175G03, MCSA176C01 e MCSA205C07 a fim de se obter melhor amplificação, bem como a quantidade de DNA que foi elevada para 30 ng.

O ciclo total de amplificação com os iniciadores foi realizado com o termociclador programado para iniciar com uma pré-desnaturação a 94°C por 3 minutos, seguida de 25 ciclos, com 45 segundos a 94°C, 30 segundos de pareamento a 46°C, 30 segundos de extensão a 73°C e 3 minutos de extensão final a 73°C.

Em função da ausência hibridação dos iniciadores MCS005C04, YCS24.043 e YCS02.047, o ciclo da reação foi modificado, em que a etapa inicial de pré-desnaturação foi de 94°C por 5 minutos, seguida de 30 ciclos, com 1 minuto a 94°C, 1 minuto de pareamento a 52°C, 1 minuto de extensão a 72°C e 7 minutos a 72°C para extensão final. Outra modificação também realizada foi

quanto ao volume total da reação que foi reduzida a um volume total de 20  $\mu$ L, no entanto a concentração dos reagentes permaneceram as mesmas, reduzindo-se apenas a enzima Taq DNA-polimerase que passou para 3 unidades, permanecendo também 20 ng de DNA. Os produtos SSR foram resolvidos sob condições desnaturantes em gel de poliacrilamida a 8%, empregando-se a metodologia proposta por Creste et al. (2001), e revelados com nitrato de prata segundo protocolo de Sanguinetti et al. (1994), com fotodocumentação através do Sistema Digital Kodak Science.

### 3.3.3.3 Análise da divergência genética para os caracteres morfológicos e moleculares

Estudos envolvendo variáveis qualitativas binárias, caracterizadas pela presença ou ausência de marca, para cada par de genótipos (*i, j*) considerado, as medidas de similaridade/dissimilaridade, baseiam-se em tabelas 2 x 2, como apresentado na Tabela 5.

**Tabela 5.** Quantificação da similaridade/dissimilaridade entre os genótipos *i* e *j*.

		Genótipo <i>i</i>		
		1	0	
Genótipo <i>j</i>	1	a	b	a+b
	0	c	d	c+d
Total		a+c	b+d	a+b+c+d

A determinação da variabilidade genética tanto para os caracteres morfológicos quanto para os dados obtidos por marcadores moleculares foi realizada através do índice de Jaccard (Jaccard, 1908) dado por:

$$s_{ij} = \frac{a}{a + b + c + d}$$

, amplamente utilizado em estudos de variabilidade genética por excluir a coincidência do tipo “0-0” como fator de similaridade. Apenas a coincidência “1-1” deve ser levada em consideração na similaridade entre dois acessos.

Para as características morfológicas avaliadas (Apêndice 1) os dados dicotômicos (binários), obtidos, foram transcritos para tabulação considerando-se

0 e 1 para cada característica avaliada, permitindo a construção de uma matriz binária ( $n \times p$ ) utilizada para a determinação dos coeficientes entre os genótipos.

Foram construídas curvas de calibração baseadas na mobilidade do marcador (1 kb) para cada gel em estudo. Através destas curvas, foi possível avaliar os tamanhos dos fragmentos de DNA produzidos. Na construção das curvas, valores de migração (cm) do marcador 1 kb fornecidos pela fotografia foram representados graficamente em comparação com valores previamente estabelecidos por tamanhos de fragmentos (peso molecular kb).

Os valores dos tamanhos dos fragmentos gerados pelas ampliações a partir dos marcadores moleculares, foram analisados quanto à presença (1) ou ausência de bandas (0) de DNA homólogas dentre os genótipos, para a construção também de uma matriz binária. Considerou-se para análise na determinação da divergência genética apenas as bandas polimórficas que não davam margens de dúvidas. As bandas fracas com pouca resolução foram desconsideradas.

O agrupamento dos genótipos foi realizado pela técnica de agrupamento UPGMA, a partir dos coeficientes obtidos pelo índice de Jaccard, o qual permitiu traçar os dendrogramas representativos dos genótipos em relação aos caracteres morfológicos. Os obtidos por marcadores moleculares, permitiram fazer uma análise comparativa quanto aos grupos formados.

#### **3.3.4 Comparação de relacionamento genético dos diferentes estimadores**

A associação entre as medidas de divergência genética foi estimada utilizando o teste de Mantel (Mantel, 1967) que compara duas matrizes entre si, elemento por elemento. Este teste, fornece ainda um valor de correlação ( $r$ ), que quantifica o grau de relacionamento entre as duas matrizes. Todas as matrizes obtidas: baseadas no coeficiente de Jaccard, através da caracterização morfológica e molecular (RAPD); da distância generalizada  $D_{ii}^2$  de Mahalanobis e da Distância Euclidiana Média Padronizada foram comparadas para obtenção da relação entre as diferentes técnicas de estimativas de divergência genética. Segundo Tatineni et al. (1996), um valor de correlação superior a 0,5 é

considerado estatisticamente significativo a 1% de probabilidade pelo teste t, se o número de unidades observadas for superior a 15.

### **3.3.5 Realização das análises estatísticas e técnicas de agrupamentos**

A análise univariada dos dados quantitativos para agrupamento das médias dos genótipos realizadas pelo critério de Scott-Knott foi efetuada através do programa estatístico Sisvar (Ferreira, 2003).

As demais análises estatísticas referentes às estimativas da variabilidade genética, obtidas pelos diferentes métodos, na determinação dos coeficientes de divergência, e as técnicas de agrupamento utilizadas, foram analisadas com o programa computacional GENES, versão Windows (Cruz, 2001).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

---

### 4.1 Análise de variância e médias dos caracteres analisados

Os resumos das análises de variância univariada inseridos na Tabela 6 apresentaram diferenças significativas a 1% de probabilidade pelo teste F, em relação à maioria dos caracteres avaliados, sendo, portanto, evidência da presença de variabilidade entre os genótipos testados. As variáveis Número de Touceiras por Parcela (NTP), Percentagem de sólidos solúveis totais no caldo (BRIX), Percentagem de sacarose aparente contida na cana (POL) e Açúcares Redutores (AR) foram as que não apresentaram significâncias.

Na Tabela 6, também estão incluídas as médias dos caracteres analisados, comparadas pelo teste de Scott-Knott. Dentre todas, a característica Tonelada de Cana por Hectare (TCH) foi a única que formou quatro grupos, maior número entre as demais características. Os genótipos que apresentaram os maiores rendimentos foram RB931011 e RB92579 com 106,50 e 107,5 TCH, respectivamente, formados pelo grupo “d”. Já os menores rendimentos foram apresentados pelos genótipos RB961 e RB94503, formados pelo grupo “a”, com 62,5 e 71,0 TCH, respectivamente. Os demais genótipos tiveram rendimentos intermediários e ficaram entre os grupos “b” e “c”.

**Tabela 6.** Comparação de médias e resumo das análises de variância univariada dos caracteres Diâmetro Médio do Colmo (DMC), Altura do Colmo (AC), Número de Touceiras por Parcela (NTP), Número de Colmos por Touceira (NCT), Número de Colmos por Parcela (NCP), Número de Entrenós por Colmo (NEC), Número de Folhas (NF), Ângulo de Inserção da Folha (AIF), Percentagem de sólidos solúveis totais no caldo (BRIX), Tonelada de Cana por Hectare (TCH), Percentagem de sacarose aparente contida na cana (POL), Açúcares Redutores: glicose e frutose (AR), Percentagem de matéria seca insolúvel em água (FIBRA). Rio Largo-AL, 2006.

Genótipos	DMC	AC	NTP	NCT	NCP	NEC	NF	AIF	BRIX	TCH	POL	AR	FIBRA
RB961	23,00 a	104,00 a	49,50 a	3,75 a	180,00 a	14,25 a	5,50 b	19,25 a	22,50 a	62,50 a	20,25 a	0,25 a	17,25 b
RB94503	25,25 a	140,00 b	48,75 a	5,00 a	237,75 b	16,25 b	4,25 a	26,50 b	23,25 a	71,00 a	20,50 a	0,75 a	14,50 a
SP79-1011	29,00 b	127,25 b	41,25 a	5,75 b	227,25 a	13,50 a	4,75 a	23,25 b	23,25 a	76,50 b	20,50 a	0,25 a	15,00 a
RB72454	29,25 b	141,50 b	39,00 a	6,00 b	234,75 b	16,00 b	5,75 b	20,75 a	23,25 a	77,75 b	20,75 a	0,25 a	15,50 a
RB951541	25,25 a	129,00 b	51,75 a	5,50 a	244,50 b	15,50 b	4,25 a	25,50 b	22,75 a	78,50 b	19,50 a	0,75 a	15,25 a
RB9364	28,00 b	140,25 b	42,75 a	6,00 b	216,75 a	17,00 b	6,25 c	25,50 b	23,50 a	81,00 b	20,50 a	0,50 a	18,25 b
RB931530	28,50 b	131,75 b	47,25 a	4,50 a	210,00 a	18,25 b	7,25 c	17,25 a	23,50 a	88,50 c	21,00 a	0,25 a	14,25 a
RB931611	26,75 a	137,50 b	46,50 a	4,75 a	213,75 a	16,50 b	5,75 b	14,25 a	22,25 a	90,00 c	20,25 a	1,00 a	13,75 a
RB931003	26,00 a	135,00 b	45,00 a	5,25 a	222,00 a	14,50 a	5,25 b	18,25 a	23,00 a	90,50 c	19,25 a	1,00 a	15,00 a
RB93509	30,75 b	125,25 b	46,50 a	4,75 a	204,00 a	16,25 b	6,25 c	22,75 b	22,25 a	95,00 c	19,50 a	0,50 a	17,00 b
RB92579	27,75 b	164,00 c	39,00 a	7,00 b	271,50 c	15,75 b	7,00 c	23,00 b	23,00 a	107,50 d	20,75 a	0,50 a	15,75 a
RB931011	26,25 a	155,75 c	39,00 a	7,00 b	264,00 c	13,50 a	5,50 b	24,50 b	23,00 a	106,50 d	20,25 a	0,50 a	17,50 b
Blocos	5,52	1220,56	626,06	13,25	380,69	4,85	0,24	39,32	1,66	347,48	6,22	0,81	12,44
Genótipos	199,63*	10099,06**	861,56 <sup>ns</sup>	40,62*	2604,9*	8,25*	3,65*	58,7*	8,44 <sup>ns</sup>	7854,25*	17,29 <sup>ns</sup>	0,31 <sup>ns</sup>	86,28*
Resíduo	105,82	6905,19	2206,69	50,6	412,6	1,46	0,55	28,32	13,11	1737,42	34,51	0,24	31,08
Media	27,12	135,94	44,688	5,351	227,19	15,6	5,65	21,68	22,88	85,88	20,29	0,54	15,71
CV(%)	6,6	10,64	18,29	23,14	8,94	7,74	13,08	24,55	2,75	8,44	5,04	25,42	6,17

Médias seguidas de letras distintas na coluna diferem a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott.

\*, Significativo em 1% de probabilidade pelo teste F.

AR, valores transformados em  $\sqrt{x+0,5}$ .

Tal evidência, pode-se atribuir ao pequeno estresse hídrico ocorrido devido a problemas na irrigação três meses após o plantio, afetando dessa forma, o comportamento de alguns genótipos com maior sensibilidade à falta d'água, como é o caso dos genótipos do grupo "a" RB961 e RB94503, contribuindo assim para o maior número de grupos formados para a variável TCH em relação às demais avaliadas.

Um segundo conjunto de variáveis com maior número de grupos formados foi Altura do Colmo (AC), Número de Colmos por Parcela (NCP) e Número de Folhas (NF), em que cada variável separou os genótipos em três grupos. Dentre todos os genótipos, em relação a estas três variáveis e a maioria das demais analisadas, RB92579 e RB931011 apresentam predominância de maiores médias, permanecendo no grupo "c", destacando-se dos demais genótipos.

#### **4.2 Correlações Fenotípicas, Genotípicas e de Ambiente entre os caracteres quantitativos utilizados para a determinação da divergência genética**

Na Tabela 7 são encontradas as estimativas dos coeficientes de correlações entre as quatro características de cana-de-açúcar utilizadas no estudo de divergência genética através da Distância Euclidiana Média Padronizada, Distância Generalizada ( $D_{II}^2$ ) de Mahalanobis e análise por Componente Principais.

A magnitude das Correlações Fenotípicas ( $r_F$ ), Genotípicas ( $r_G$ ) e de Ambiente ( $r_A$ ) apresentaram valores mínimos de -0,0253, 0,0021 e -0,0713 e máximos de -0,7570, -0,9328 e -0,6576, respectivamente.

O caráter POL apresentou Correlações Fenotípicas e Genotípicas negativas com a variável TCH, com valores de -0,0253 e -0,1786, respectivamente. Apesar de baixa magnitude, indica que a seleção no intuito de se elevar a produtividade agrícola (TCH), tem-se um leve prejuízo na percentagem de sacarose aparente da cana (POL cana). As magnitudes das correlações obtidas no presente trabalho são semelhantes às obtidas por Barbosa

(1979) e Silva (2006). As variáveis Açúcares Redutores (AR) e percentagem de matéria seca insolúvel em água (FIBRA) apresentaram correlações positivas com TCH, evidenciando aumento nestas variáveis quando se tem também elevação na produtividade agrícola (TCH). A variável AR teve correlação negativa de elevada magnitude com a variável POL e baixa em relação à FIBRA. Esta, por sua vez, apresentou valores positivos com POL, no entanto, com baixa magnitude, indicando não haver relação entre estas variáveis.

No ambiente em estudo, verifica-se que em quase todos os casos, os Coeficientes de Correlações Genotípicas foram mais elevados do que os de Correlações Fenotípicas e de Ambiente, o que indica moderada influência do ambiente na expressão dos caracteres em observação (Soares, 1991). Segundo Falconer (1987), as diferenças de sinais observados entre correlações genotípicas e de ambiente, indicam que as causas de variação genética de ambiente influenciaram os caracteres através de mecanismos fisiológicos diferentes, o que foi evidenciado no presente trabalho em relação às correlações entre TCH com POL, AR e FIBRA. Isto quer dizer que as mudanças nas condições de ambiente produzem efeitos contrários deste com os demais caracteres.

**Tabela 7.** Estimativas dos Coeficientes de Correlações Fenotípicas ( $r_F$ ), Genotípicas ( $r_G$ ) e de Ambiente ( $r_A$ ) entre quatro características estudadas (TCH, POL, AR e FIBRA) em 12 genótipos de cana-de-açúcar.

Características	r	POL	AR	FIBRA
TCH	F	-0,0253	0,2750	0,1014
	G	-0,1786	0,5344	0,1213
	A	0,3060	-0,2083	-0,0713
POL	F	-	-0,7570	0,0608
	G	-	-0,9328	0,0021
	A	-	-0,6576	0,2110
AR	F	-	-	-0,2837
	G	-	-	-0,3877
	A	-	-	-0,2008

### 4.3 Divergência genética através dos caracteres quantitativos

#### 4.3.1 Distância Euclidiana Média Padronizada

Os valores das dissimilaridades geradas pela Distância Euclidiana Média Padronizada entre os genótipos estudados encontram-se inseridos na Tabela 8. Entre os quatro pares mais dissimilares, a análise das Distâncias Euclidianas identificou as combinações RB931611 - RB72454 e RB931611 - RB931530 como os pares de genótipos mais divergentes, com valores de 2,38 e 2,27, respectivamente. Estes materiais não são aparentados, portanto, esperavam-se as maiores distâncias entre eles. A terceira e quarta combinação mais divergente foi apresentada pelos pares de genótipos RB931611 - SP79-1011, com 2,26 e RB931611 - RB951541 com 2,24, apesar de serem genótipos provenientes de cruzamentos próximos.

O oposto foi conferido para os pares RB931530 - RB72454 (0,35), que apesar de não apresentar relação de parentesco, a Distância Euclidiana Média identificou estes genótipos como sendo os mais similares entre os demais. O segundo par de genótipos com maior similaridade é SP79-1011 - RB951541 (0,45), revelando sua proximidade, visto que SP79-1011 é o pai RB951541. Já a terceira maior similaridade com 0,47 foi conferida por RB92579 em relação aos genótipos RB931003 e RB961, entretanto estes materiais também não apresentam relação de parentesco com RB92579.

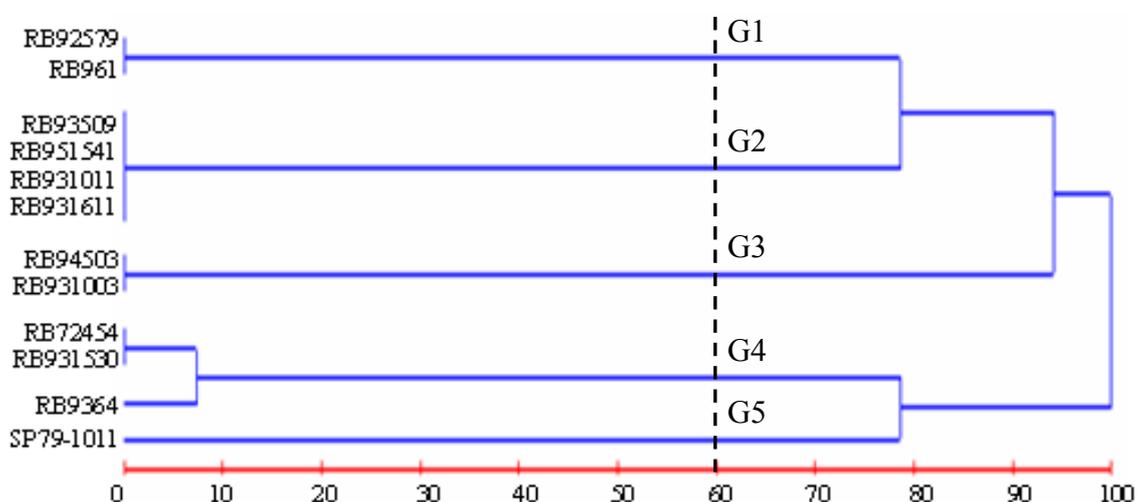
**Tabela 8.** Medidas de dissimilaridade entre 12 genótipos de cana-de-açúcar em relação a quatro características (TCH, POL, AR e FIBRA) com base na Distância Euclidiana Média Padronizada.

Genótipo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>1 RB9364</b>	-											
<b>2 RB931011</b>	1,76	-										
<b>3 RB94503</b>	0,73	1,12	-									
<b>4 RB93509</b>	0,74	1,37	0,85	-								
<b>5 RB72454</b>	1,30	1,45	1,07	1,17	-							
<b>6 RB951541</b>	0,80	2,11	1,26	0,98	1,11	-						
<b>7 SP79-1011</b>	0,89	1,76	1,10	0,78	0,74	<b>0,45</b>	-					
<b>8 RB931530</b>	1,27	1,50	1,16	1,00	<b>0,35</b>	0,98	0,55	-				
<b>9 RB92579</b>	0,94	2,16	1,40	0,99	1,73	0,91	1,10	1,57	-			
<b>10 RB931003</b>	0,63	1,98	1,18	0,66	1,53	0,75	0,89	1,36	<b>0,47</b>	-		
<b>11 RB961</b>	1,22	2,23	1,64	1,02	1,94	1,18	1,29	1,71	<b>0,47</b>	0,62	-	
<b>12 RB931611</b>	2,16	1,56	1,86	1,73	<b>2,38</b>	<b>2,24</b>	<b>2,26</b>	<b>2,27</b>	1,90	2,00	1,82	-

Por meio da análise da Figura 1, obtida pelo Método Hierárquico do “Vizinho mais Distante”, entre os genótipos, com um corte de 60%, é possível estabelecer a formação de cinco grupos. Apesar da Distância Euclidiana Média Padronizada ter demonstrado pouca relação quanto à separação dos genótipos entre os mais e menos similares quando considerado o grau de parentesco, pode-se verificar, que dois grupos são constituídos por genótipos próximos dentro do mesmo grupo, o grupo 2 (G2) formado pelos genótipos RB93509, RB951541, RB931011 e RB931611 e o grupo 3 (G3) com RB94503 e RB931003.

O primeiro grupo (G1) foi formado pelos genótipos RB92579 com RB961, e estes genótipos não são aparentados, no entanto apresentaram a terceira maior similaridade genética (Tabela 8). O quarto grupo (G4) foi conferido pelos genótipos RB72454, RB931530 e RB9364, e o quinto grupo (G5) formado por apenas SP79-1011.

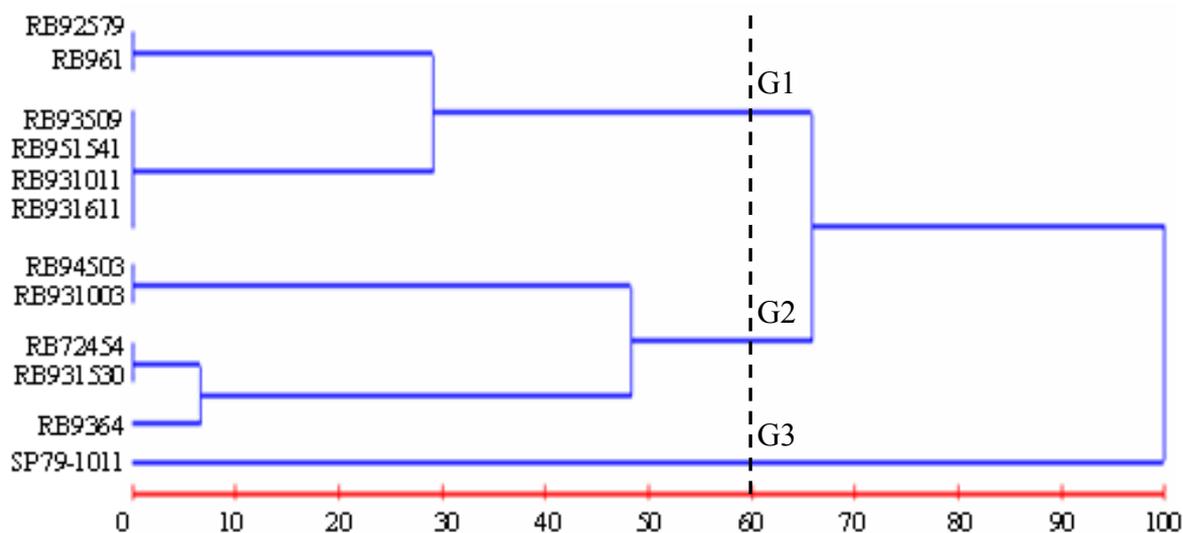
O método de agrupamento pelo “Vizinho mais Distante” tem sido amplamente utilizado no melhoramento genético por ter a capacidade de discernir grupos separados por pequenas distâncias, o que permite a formação de um maior número de grupos, estabelecendo-se assim maiores chances de grupos únicos.



**Figura 1.** Dendrograma entre 12 genótipos de cana-de-açúcar pelo método de agrupamento do “Vizinho mais Distante” utilizando como medida de dissimilaridade a Distância Euclidiana Média Padronizada.

Já quando se tem o agrupamento por UPGMA (Figura 2), considerando o mesmo ponto de corte de 60%, o número de grupos foi reduzido, havendo a formação de apenas três grupos. No entanto, o genótipo SP79-1011 aparece

novamente formando um grupo único separado totalmente dos demais. Os genótipos que constituíam o G1 e o G2 pelo método de agrupamento do “Vizinho mais Distante” (Figura 1), passaram a formar um só grupo (G1). O mesmo ocorreu para os genótipos do G3 e G4 que formaram também um grupo único (G2) pela técnica UPGMA.



**Figura 2.** Dendrograma entre 12 genótipos de cana-de-açúcar pelo método UPGMA utilizando como medida de dissimilaridade a Distância Euclidiana Média Padronizada.

#### 4.3.2 Distância Generalizada $D_{ii}^2$ de Mahalanobis

Os resultados obtidos das distâncias  $D_{ii}^2$  de Mahalanobis entre os genótipos estão apresentados na Tabela 9. Apesar de serem irmãos (provenientes do mesmo progenitor feminino) esta técnica identificou RB94503 e RB931011 como sendo o par de genótipos mais dissimilar entre os demais, cuja distância foi de 39,30, além de um terceiro e quarto par de genótipos que apresentam alta relação de parentesco, RB961 - RB931011 (34,80) e SP79-1011 - RB931011 (29,18). Apenas o segundo e o quinto par de genótipos mais dissimilares identificados pela  $D_{ii}^2$  não apresentam relação de parentesco e foi formado pelos materiais RB961 - RB92579 (36,75) e RB92579 - RB94503 (29,08).

Já o par de genótipos com maior similaridade foi conferido pelo par de genótipos aparentados SP79-1011 - RB94503 (0,77), enquanto o segundo, terceiro e quarto pares similares foram constituídos pelos genótipos SP79-1011 e RB72454 (0,81), RB931611 e RB931530 (1,67), RB931530 e SP79-1011 (2,27), os quais não apresentam relação de parentesco.

**Tabela 9.** Medidas de dissimilaridade entre 12 genótipos de cana-de-açúcar em relação a quatro características (TCH, POL, AR e FIBRA) com base na Distância Generalizada de Mahalanobis ( $D_{ii}^2$ ).

Genótipos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>1 RB9364</b>	-											
<b>2 RB931011</b>	12,69	-										
<b>3 RB94503</b>	19,85	<b>39,3</b>	-									
<b>4 RB93509</b>	7,68	2,8	24,41	-								
<b>5 RB72454</b>	8,73	23,56	2,58	13,13	-							
<b>6 RB951541</b>	9,27	19,15	6,08	8,78	3,07	-						
<b>7 SP79-1011</b>	14,45	<b>29,18</b>	<b>0,77</b>	16,92	<b>0,81</b>	3,42	-					
<b>8 RB931530</b>	15,75	20,87	5,01	12,81	2,76	5,22	<b>2,27</b>	-				
<b>9 RB92579</b>	16,25	4,79	<b>29,08</b>	6,61	17,7	14,25	20,74	11,77	-			
<b>10 RB931003</b>	14,58	13,24	13,7	6,83	8,91	2,97	9	6,28	6,65	-		
<b>11 RB961</b>	7,73	<b>34,8</b>	10,81	20,88	6,87	10,26	9,93	17,92	<b>36,75</b>	23,19	-	
<b>12 RB931611</b>	20,88	21,18	7,49	12,45	6,32	4,83	4,53	<b>1,67</b>	11,45	3,44	23,77	-

De acordo com os resultados entre os dois estimadores de divergência genética, verifica-se que houve um contraste elevado quanto aos resultados obtidos pela Distância Euclidiana Média em relação à distância  $D_{ii}^2$  de Mahalanobis. Os genótipos RB931611 e RB931530 mostraram-se como o terceiro par de genótipos mais divergentes pela Distância Euclidiana Média com valor de 2,27, ocorrendo o oposto pela a distância  $D_{ii}^2$  de Mahalanobis, apresentando-se como o terceiro para de genótipos com menores distâncias (1,67). Verifica-se também que a menor e a maior distância obtida pela Distância Euclidiana Média foi entre o par de genótipos não aparentados RB931530 - RB72454 e RB72454 - RB931611, respectivamente. Contudo, pela  $D_{ii}^2$  de Mahalanobis o par com menor e maior distância ocorreu entre os materiais aparentados SP79-1011 - RB94503 e RB931011 - RB94503, respectivamente.

Pela análise do Método de Otimização de Tocher (Tabela 10), foi registrada a formação de quatro grupos, sendo que dois grupos foram constituídos por apenas um único genótipo, o grupo III formado pelo RB9364 e o

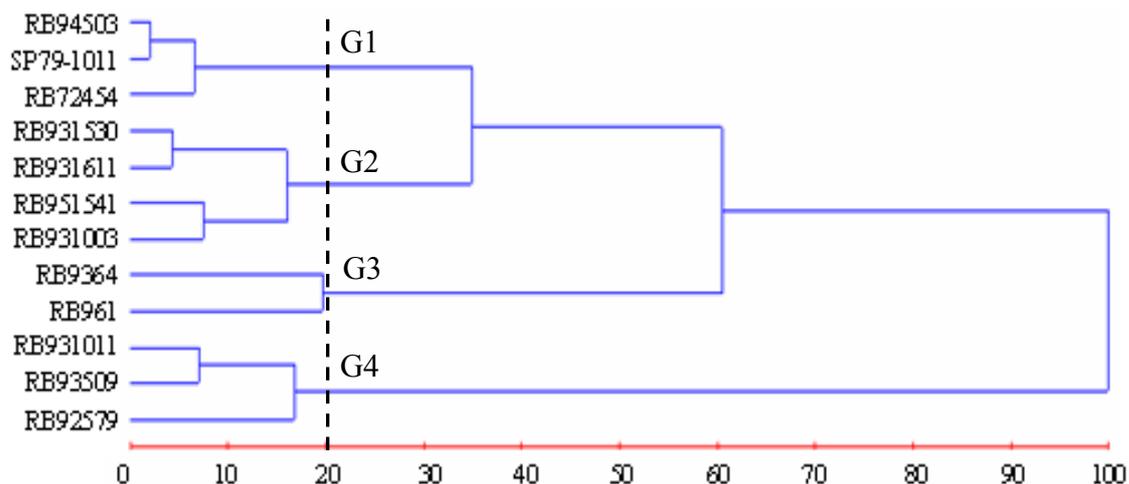
grupo IV composto por RB961. Destaca-se que o grupo III foi configurado pela presença de RB93509, RB931011 e RB92579. Os demais genótipos correspondem ao grupo I (RB94503, SP79-1011, RB72454, RB931530, RB951541, RB931611 e RB931003), os quais apresentaram a menor magnitude de dissimilaridade, obtidos pela  $D_{II}^2$  de Mahalanobis (Tabela 9). Os grupos III e IV formados respectivamente pelos genótipos RB9364 e RB961 indicam elevada divergência destes para com os demais, confirmando os valores elevados das distâncias nos pares em que participou.

Analisando entre e dentro dos grupos formados, verifica-se novamente que não há relação da formação destes quando considerado o grau de parentesco dos genótipos. Entretanto, como a distância  $D_{II}^2$  de Mahalanobis quantifica a dissimilaridade genética, conforme enfatizado por Benin et al. (2003), a constituição destes grupos são muito mais seguras quando comparadas com a Distância Euclidiana Média Padronizada.

**Tabela 10.** Agrupamento pelo Método de Tocher de 12 genótipos de cana-de-açúcar, com base na Distância Generalizada de Mahalanobis ( $D_{II}^2$ ) em relação a quatro características: TCH, POL, AR e FIBRA.

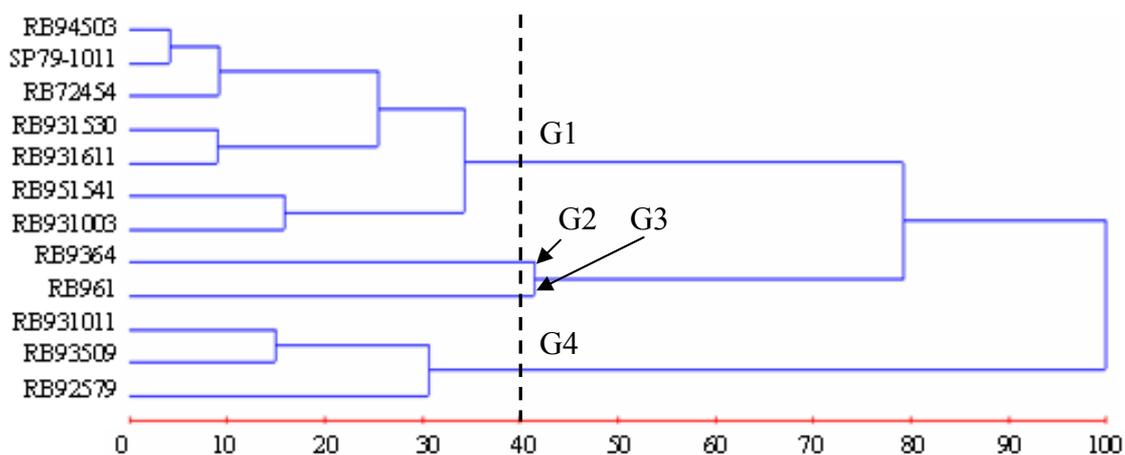
Grupo	Genótipos						
I	RB94503	SP79-1011	RB72454	RB931530	RB951541	RB931611	RB931003
II			RB93509	RB931011	RB92579		
III				RB9364			
IV				RB961			

Com base no Método Hierárquico do “Vizinho mais Distante” (Figura 3), com um corte em 20%, tem-se também a formação de quatro grupos, porém, os genótipos RB9364 e RB961 que se encontravam separados formando grupo individual pelo método de Tocher (Tabela 9), passaram-se para um grupo único (G3). A formação desses dois grupos só é visível abaixo de 20%. O grupo I gerado pelo agrupamento de Tocher foi separado em dois grupos, um grupo (G1) composto pelos genótipos RB94503, SP79-1011 e RB72454 e outro grupo (G2) constituído dos genótipos RB931530, RB931611, RB951541 e RB931003.



**Figura 3.** Dendrograma obtido com a técnica de agrupamento pelo método “Vizinho mais Distante” utilizando como medida de dissimilaridade a Distância Generalizada de Mahalanobis ( $D_{ii}^2$ ).

Por meio de análise da Figura 4, obtida pelo método de agrupamento UPGMA, com um corte de 40% foi estabelecida a formação dos quatro grupos, assim como observado no método de Tocher (Tabela 10), apresentando total concordância destas duas técnicas de agrupamento, o que não ocorreu pelo método “Vizinho mais Distante” (Figura 3).



**Figura 4.** Dendrograma utilizando o método de agrupamento UPGMA com base na distância generalizada de Mahalanobis ( $D_{ii}^2$ ).

Apesar da concordância total no resultado das análises pelas duas técnicas (Tocher e UPGMA), Amaral Jr (1996), referindo-se aos métodos de agrupamento utilizados, alerta para o modo subjetivo como são caracterizados os grupos nos métodos hierárquicos, relatando, ainda que há maior confiabilidade nos métodos de otimização em relação aos hierárquicos, por proporcionar a formação de grupos independentes, não-correlacionados. Segundo Everitt (1977)

a análise de agrupamento é uma técnica multivariada essencialmente descritiva e requer cuidados em sua aplicação, devido aos muitos problemas a ela associados. Entretanto, o autor afirma não existir um método que possa ser considerado melhor ou pior em todas as situações, tudo irá depender do tipo de dado com o qual está trabalhando e também da estrutura nele contida. O pesquisador precisa decidir quanto à medida de distância ou ao coeficiente de similaridade e à técnica de agrupamento, tanto hierárquicos quanto de otimização, cada um com suas limitações e pressuposições (Pereira e Cruz, 2003).

Com base nos resultados obtidos por meio da Distância Euclidiana Média e a Generalizada  $D_{ii}^2$  de Mahalanobis, pode-se observar a não concordância dos coeficientes gerados e também os padrões de agrupamento por parte dos dois métodos utilizados. A discrepância entre a Distância Euclidiana Média e a  $D_{ii}^2$  Mahalanobis pode ser bem visualizada através da análise de seus correspondentes dendrogramas, oriundos da análise de conglomeração, inseridos nas Figuras de 1 a 4.

Benin et al. (2003) enfatiza que nem sempre estas duas técnicas empregadas têm estabelecido a mesma formação de grupos e tem concordado na identificação de qual combinação intragrupal específica, dentre as muitas possíveis, é a mais divergente. Em face ao exposto, verifica-se que o padrão de agrupamento é consistente apenas quando os métodos são utilizados fazendo-se uso da mesma medida de distância, ou seja, provindos dos mesmos coeficientes.

Na Tabela 11 está representada a forma de se identificar as contribuições relativas de cada caráter para a divergência observada conforme as duas técnicas utilizadas e consiste basicamente em fazer a partição do total de  $D_{ii}^2$  e Euclidiana (considerando todos os possíveis pares entre indivíduos) nas partes devidas a cada caráter. Verifica-se que a variável TCH foi a que mais contribuiu para a divergência em relação às duas técnicas utilizadas, sendo responsável por 98,54% da distância total quando utilizada a Distância Euclidiana Média e 52,52% a partir da  $D_{ii}^2$  de Mahalanobis. A segunda variável de maior contribuição em relação à distância total é a FIBRA, que apesar de se apresentar pouco expressiva (1,38%) na Distância Euclidiana Média, na  $D_{ii}^2$  de Mahalanobis contribuiu de forma significativa com 35,57%. Os dois caracteres relativos a açúcar (POL e AR) apresentaram pequenas estimativas de  $S_j$  nas duas técnicas

utilizadas. Na Distância Euclidiana Média, POL apresenta-se como a terceira variável de maior contribuição para a divergência, mostrando-se pouco superior em relação a variável AR, enquanto na  $D_{ii}^2$  de Mahalanobis estas duas variáveis apresentaram praticamente mesma contribuição.

**Tabela 11.** Contribuição relativa de cada variável ( $S_j$ ) para divergência genética entre os 12 genótipos de cana-de-açúcar, segundo Singh (1981).

VARIÁVEL	Distância Euclidiana Média		Distância de Mahalanobis	
	$S_j$	(%)	$S_j$	(%)
TCH	36332	98,538	436,884	52,521
POL	30,385	0,083	49,188	5,913
AR	0,956	0,003	49,836	5,991
FIBRA	507,404	1,376	295,922	35,575

TCH: tonelada de cana por hectare; POL: porcentagem de sacarose da cana; AR: açúcares redutores (glicose e frutose); FIBRA: porcentagem de matéria seca insolúvel em água.

#### 4.3.3 Componentes Principais

As estimativas dos autovalores ( $\lambda_j$ ) correspondentes aos primeiros Componentes Principais ( $CP_j$ ) e as variâncias associadas estão apresentadas na Tabela 12. De acordo com os dados avaliados, a análise dos dois primeiros Componentes Principais com base nas quatro características avaliadas em relação aos doze genótipos estudados, explicaram 69,43%. Os valores encontrados estão próximos do que Cruz e Regazzi (2001) recomendam que é em torno de 80%. No entanto, o valor encontrado no presente trabalho pode não satisfazer os critérios para inferências em divergência genética, devido à ocorrência de distorções das coordenadas de cada genótipo na dispersão gráfica bidimensional, conforme enfatizado por estes autores. Sendo assim, considerando os três primeiros Componentes Principais a variação contida nos caracteres originais aumentou consideravelmente para 93,76% quando neles se incluíram a terceira raiz. Resultado semelhante em cana-de-açúcar foi obtido por Silva (2006), com base em oito características estudadas também em 12 genótipos, onde os três primeiros Componentes Principais acumularam 82,99%,

enquanto Barreto (2004), fazendo-se uso também desta técnica na avaliação da divergência de 105 genótipos de cana-de-açúcar da coleção de um banco de germoplasma, os três Primeiros Componentes Principais acumularam uma a explicação da variância de apenas 71,99%, provavelmente pela ausência de planejamento estatístico.

Silva et al. (2005) avaliando a divergência genética em 129 clones de cana-de-açúcar por meio de variáveis canônicas em dois experimentos, as duas primeiras variáveis foram suficientes para explicarem cerca de 99,51% e 99,71% em cada um dos experimentos, sendo que a primeira variável mais importante de todas em cada ensaio explicou 91,50 e 95,94 respectivamente, esgotando praticamente esta variabilidade.

**Tabela 12.** Estimativas dos autovalores ( $\lambda_j$ ) correspondentes às percentagens de variação explicadas pelos Componentes Principais e respectivos Coeficientes de Ponderação (Autovetores) das quatro características avaliadas (TCH, POL, AR e FIBRA) em 12 genótipos de cana-de-açúcar.

Componente Principal (CP)	Autovalores		Coeficientes de ponderação associados às variáveis			
	$\lambda_j$	$\lambda_j$ (%)	TCH	POL	AR	FIBRA
Y <sub>1</sub>	1,764273	44,10683	0,0890	0,6839	-0,6916	0,2145
Y <sub>2</sub>	1,01293	69,43008	0,9764	0,0753	0,1627	-0,1204
Y <sub>3</sub>	0,97323	93,76084	0,1215	-0,2281	0,0884	0,9620
Y <sub>4</sub>	0,249567	100,00	0,1548	-0,6889	-0,6981	-0,1187

A característica que menos contribuiu para este estudo de divergência por Componentes Principais foi AR (açúcares redutores), por apresentar maior valor absoluto entre as características para o autovetor quatro. Desta forma, esta característica dentre as quatro analisadas pode ser descartada, que não causa prejuízo no presente estudo, pois é dispensável para a avaliação da divergência genética por ser explicada por outros caracteres (Santos et al., 1995). Sendo assim, o caráter AR teve a menor importância para a diversidade entre os genótipos, corroborando com os resultados obtidos pela Distância Euclidiana

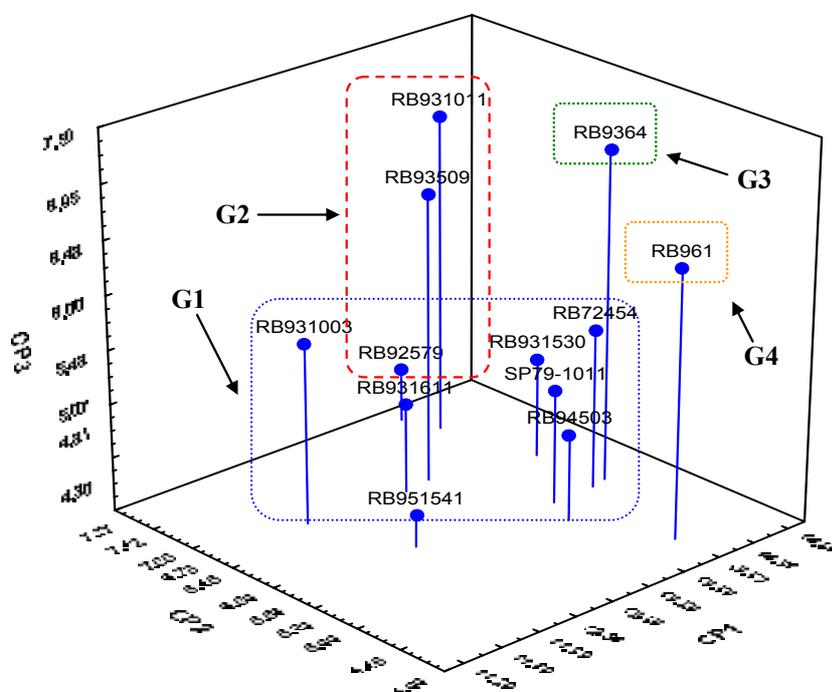
Média, na qual esta variável mostrou-se como a última a contribuir para a divergência por apresentar o menor valor percentual. Esta variável também apresentou pequena contribuição através da  $D_{II}^2$  de Mahalanobis, apesar de se mostrar praticamente com valores iguais a variável POL. De acordo com os resultados obtidos, a pequena contribuição de AR é reforçada também pelo aspecto da redundância, visto que AR é indiretamente representado por TCH e POL, com Correlações Fenotípicas e Genotípicas negativas e positivas com estas variáveis, com valores iguais a 0,2750 e 0,5344; -0,7570 e -0,9328, respectivamente, conforme discutido no item 4.2 e mostrado na Tabela 6.

Os escores relativos aos três primeiros Componentes Principais associados aos 12 genótipos avaliados encontram-se inseridos na Tabela 13, os quais foram utilizados na dispersão gráfica para representação espacial da divergência genética em gráfico 3D, conforme ilustrado na Figura 5.

**Tabela 13.** Escores dos 12 genótipos de cana-de-açúcar avaliados em relação aos três primeiros Componentes Principais, obtidos a partir de quatro caracteres TCH, POL, AR e FIBRA.

Nº	Genótipos Avaliados	Escore		
		CP1	CP2	CP3
01	RB9364	14,387	5,709	7,066
02	RB931011	14,095	7,416	6,955
03	RB94503	13,604	5,329	4,807
04	RB93509	13,303	6,696	6,667
05	RB72454	14,208	5,665	5,484
06	RB951541	12,345	5,798	4,299
07	SP79-1011	13,754	5,658	5,065
08	RB931530	14,307	6,445	4,929
09	RB92579	13,968	7,769	4,497
10	RB931003	11,993	6,726	5,681
11	RB961	13,985	4,481	6,483
12	RB931611	13,007	6,649	4,831

A dispersão gráfica realizada com os dois primeiros Componentes Principais não apresentou nenhuma concordância com as técnicas de agrupamento utilizadas no presente trabalho, formando grupos de genótipos completamente diferentes aos obtidos nas técnicas de agrupamentos anteriores possivelmente, devido à baixa explicação obtida (69,43%), não acumulando o mínimo necessário para uma descrição segura da divergência entre os genótipos, não satisfazendo os critérios para inferências de divergência genética, possivelmente devido à ocorrência de distorções das coordenadas de cada genótipo na dispersão gráfica bidimensional, conforme enfatizado por Cruz e Regazzi (2001). Dessa forma, a dispersão gráfica (Figura 5) obtida quando se considerou os três primeiros Componentes Principais (explicação 93,76%) passou a ter praticamente a mesma concordância com as técnicas de agrupamentos realizadas por Tocher e UPGMA, obtidos a partir da distância  $D_{ii}^2$  de Mahalanobis, separando os genótipos nos mesmos grupos formados. Isto evidencia a completa identidade entre as distâncias  $D_{ii}^2$  de Mahalanobis e a gerada por Componentes Principais (setas indicadas por G1, G2, G3 e G4 na Figura 5, mostram os mesmos grupos formados), ao passo que estas técnicas não apresentaram concordância com a Distância Euclidiana Média Padronizada.



**Figura 5.** Dispersão gráfica dos escores, em relação aos eixos representativos dos três primeiros Componentes Principais (CP1, CP2 e CP3) de quatro caracteres avaliados em 12 genótipos de cana-de-açúcar.

Cruz (1990) recomenda a utilização da Distância Euclidiana Média e análise por Componentes Principais em experimentos que não contemplam repetição, por ser difícil a quantificação da influência do ambiente que atua sobre as constituições genéticas, sendo recomendadas para avaliação de acessos em banco de germoplasma, em que o número considerado de genótipos inviabiliza a utilização de delineamento experimental. Entretanto, a Distância Generalizada  $D_{II}^2$  de Mahalanobis pode ser estimada apenas quando o delineamento contempla repetição, permitindo a quantificação dos efeitos do ambiente sobre as constituições genéticas. Desta forma, fica evidente que as Distâncias Euclidiana Média Padronizada e por Componentes Principais possibilitaram inferências sobre a dissimilaridade fenotípica, enquanto a Distância Generalizada  $D_{II}^2$  de Mahalanobis quantificaram a dissimilaridade genética, conforme enfatizado por Benin et al. (2003). Sendo assim, esperavam-se as mesmas inferências para a Distância Euclidiana Média e a gerada por Componentes Principais, o que não ocorreu no presente estudo. A Distância Euclidiana Média Padronizada não apresentou nenhuma concordância com as técnicas utilizadas. A concordância apresentada foi entre as distâncias  $D_{II}^2$  de Mahalanobis e a obtida por Componentes Principais, o que permitiu tirar as mesmas inferências quanto à dissimilaridade dos genótipos estudados.

#### **4.4 Diversidade genética a partir de caracteres morfológicos e por marcadores moleculares**

##### **4.4.1 Caracteres morfológicos**

No Apêndice 2, tem-se a matriz binária (n x p) 12 x 31 construída a partir das 31 características qualitativas consideradas para o estudo quanto à diversidade genética no presente trabalho.

Os coeficientes de similaridades através do índice de Jaccard obtidas entre os genótipos estudados encontram-se inseridos na Tabela 13. Os genótipos que apresentaram as menores similaridades foram os pares RB93509 e RB94503, RB931530 e RB931011, e RB93509 com RB931611, cujos coeficientes foram respectivamente 0,34, 0,35 e 0,36. Enquanto os genótipos mais similares

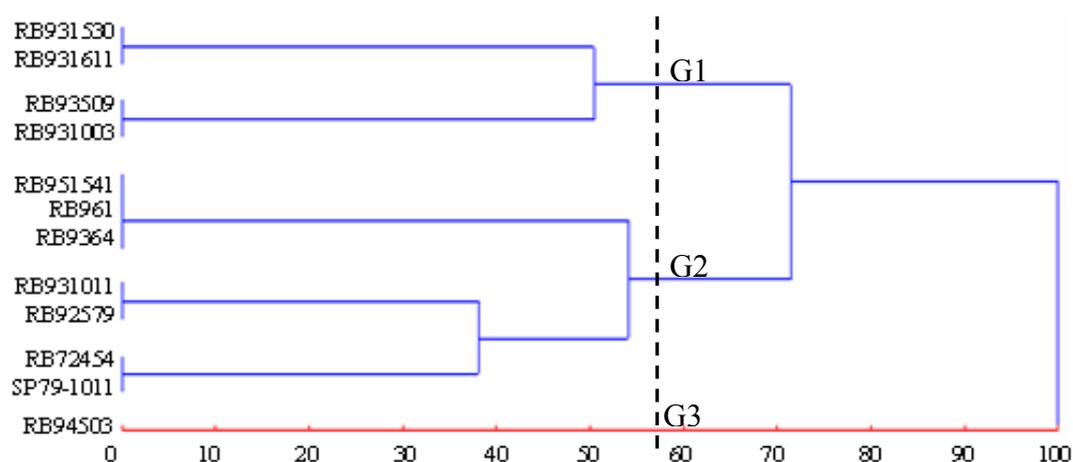
foram os pares RB931003 e RB951541, com coeficiente 0,88, SP79-1011 e RB9364, com 0,77. Os pares RB72454 com RB931011 e RB72454 com RB951541 apresentaram o mesmo coeficiente de 0,74.

A partir dos coeficientes apresentados na Tabela 14 foram construídos também dendrogramas com base na técnica de agrupamento pelo método UPGMA, técnica utilizada anteriormente na formação de grupos a partir dos coeficientes obtidos pela Distância Euclidiana Média Padronizada e a Distância Generalizada  $D_{ii}^2$  de Mahalanobis.

**Tabela 14.** Coeficientes de similaridade genética através do índice de Jaccard entre 12 genótipos de cana-de-açúcar calculados a partir de dados baseados em 31 características morfológicas.

Genótipo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1 RB9364	-											
2 RB931011	0,53	-										
3 RB94503	0,43	0,61	-									
4 RB93509	0,48	0,50	<b>0,34</b>	-								
5 RB72454	0,61	<b>0,74</b>	0,52	0,46	-							
6 RB951541	0,53	0,71	0,67	0,50	<b>0,74</b>	-						
7 SP79-1011	<b>0,77</b>	0,55	0,45	0,50	0,62	0,60	-					
8 RB931530	0,48	<b>0,35</b>	0,44	0,44	0,41	0,50	0,50	-				
9 RB92579	0,54	0,67	0,50	0,44	0,63	0,67	0,61	0,50	-			
10 RB931003	0,52	0,63	0,70	0,54	0,66	<b>0,88</b>	0,63	0,54	0,64	-		
11 RB961	0,56	0,69	0,52	0,52	0,65	0,69	0,57	0,46	0,64	0,61	-	
12 RB931611	0,62	0,52	0,58	<b>0,36</b>	0,59	0,57	0,63	0,46	0,58	0,61	0,60	-

O agrupamento dos genótipos baseado no coeficiente de Jaccard obtidas a partir de características morfológicas permitiu separar os materiais em três grandes grupos, adotando a distância genética média (Tabela 17) obtida entre todos os possíveis pares de genótipos como ponto de corte, conforme mostrado na Figura 6. O grupo 1 (G1) foi formado pelos genótipos RB931530, RB931611, RB93509 e RB931003. O grupo 2 (G2) constituiu o maior grupo, com sete genótipos formado por RB951541, RB961, RB9364, RB931011, RB92579, RB72454 e SP79-1011. O grupo 3 (G3) formou um grupo único, estabelecido pelo genótipo RB94503.

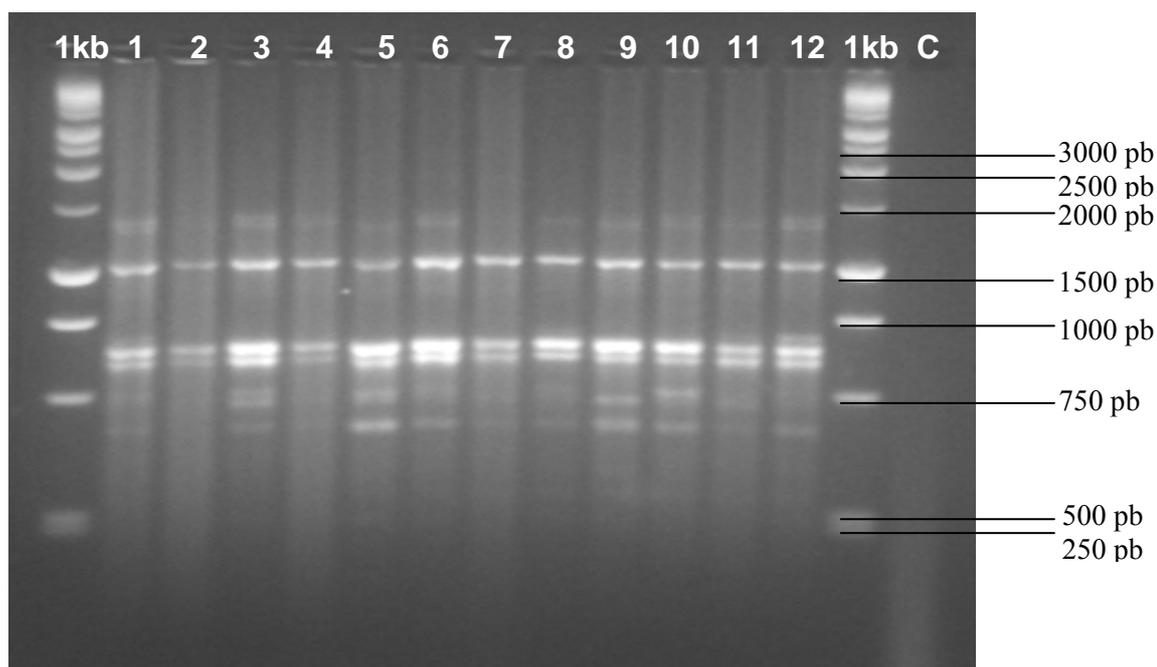


**Figura 6.** Dendrograma representativo da divergência genética obtido pela técnica de agrupamento UPGMA, utilizando o coeficiente de similaridade de Jaccard, com base em 31 caracteres qualitativos de 12 genótipos de cana-de-açúcar.

De forma geral os genótipos apresentaram considerável distância genética, já que a similaridade genética média foi de 0,57 (Tabela 17). Dentre outras formas de separar os genótipos, o dendrograma é útil, uma vez que permite identificar possíveis combinações divergentes, que permitam explorar a heterose e a troca de material genético.

#### 4.4.2 Marcadores moleculares RAPD

A análise genética dos genótipos de cana-de-açúcar com onze oligonucleotídeos iniciadores, resultaram em 107 fragmentos amplificados, dos quais, 87 (81,31%) apresentaram polimorfismo. Cada um dos onze primers utilizados para a análise dos dados, amplificaram de 7 bandas (OPA 1 e OPA 3) a 13 bandas (OPA 20). Os fragmentos polimórficos amplificados considerados neste estudo variaram em tamanho de 250 a 1995 pb para a os primers utilizados, conforme apresentado na Tabela 15. Na Figura 7, tem-se um exemplo do produto de amplificação obtido com primer OPA 9.



**Figura 7.** Polimorfismo detectado por RAPD em 12 genótipos de cana-de-açúcar utilizando o primer OPA 9. Primeira e penúltima linha: marcador 1kb Ladder, C-amostra controle. 1-RB9364, 2-RB931011, 3-RB94503, 4-RB93509, 5-RB72454, 6-RB951541, 7-SP79-1011, 8-RB931530, 9-RB92579, 10-RB931003, 11-RB961, 12-RB931611.

Os resultados das demais amplificações genômicas reveladas em gel de agarose encontram-se ilustrado no Apêndice 3. A transcrição das amplificações através de código binário quanto à presença (1) ou ausência (0) das bandas polimórficas permitiu a construção de uma matriz de ordem 87 x 12, encontra-se inserida no Apêndice 4.

**Tabela 15.** Número e tamanho dos fragmentos amplificados obtidos com as seqüências iniciadoras de RAPD utilizadas na análise genética de 12 genótipos de cana-de-açúcar.

<i>Primer</i>	Seqüência do iniciador (5' → 3')	Número de fragmentos		Tamanho dos fragmentos (pb)
		Amplificados	Polimórficos	
OPA 1	CAG GCC CTT C	7	5	251-630-668-794-851-891-1737
OPA 2	TGC CGA GCT G	10	10	576-630-645-668-707-724-803-891-944-989
OPA 3	AGT CAG CCA C	7	4	691-708-740-851-891-1047-1513
OPA 4	AAT CGG GCT G	12	9	524-607-700-741-758-776-794-851-912-1122-1380-1480
OPA 7	GAA ACG GGT G	11	10	250-495-530-602-623-645-762-831-891-1059-1621
OPA 8	GTG ACG TAG G	9	9	602-628-707-755-794-851-870-912-1000
OPA 9	GGG TAA CGC C	9	6	676-741-776-831-870-933-1513-1778-1972
OPA 10	GTG ATC GCA G	10	6	562-602-645-707-794-912-944-1122-1318-1489
OPA 16	AGC CAG CGA A	9	8	645-691-707-785-891-944-1148-1396-1462
OPA 18	AGG TGA CCG T	10	9	524-588-596-616-683-794-891-1083-1380-1496
OPA 20	GTT GCG ATC C	13	11	595-630-668-687-707-794-912-933-1188-1333-1469-1737-1995
Total		107	87	

Os coeficientes de similaridades obtidos pela análise molecular a partir de RAPD também pelo índice de Jaccard encontram-se na Tabela 16. A média dos coeficientes foi de 0,54 (Tabela 17), muito próxima à média obtida por características morfológicas (0,56), evidenciando também considerável divergência genética entre os genótipos, revelando boa concordância entre as duas técnicas (morfológica e RAPD) para quantificar a divergência genética em cana-de-açúcar. Resultados semelhantes com esta cultura foram encontrados por Queme et al. (2005) trabalhando com SSR, obtendo uma variação de 0 a 0,52, entre cada par de genótipos. Lima et al. (2002) também obtiveram considerável variabilidade genética por meio de AFLP, com valores de 0,28 a 0,89, e média de 0,47.

Entre os seis pares menos similares, a análise dos coeficientes de Jaccard obtidas por RAPD identificou as combinações RB931003 - RB93509 e

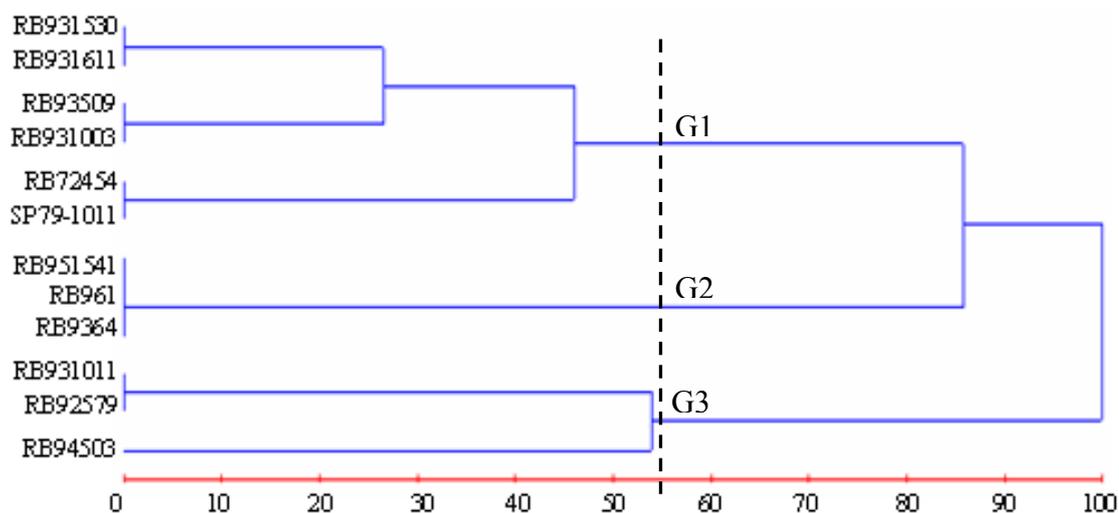
SP79-1011 - RB93509, com coeficientes de 0,35 e 0,40, respectivamente, e os pares RB931011 - RB93509, RB931530 - RB93509, RB931611 - RB93509, RB961 - RB93509, com o mesmo coeficiente de 0,42, enquanto as maiores similaridades foram conferidas por dois pares de genótipos RB951541 - RB94503 e RB951541 - RB72454, com 0,69. Apenas dois pares de genótipos coincidiram dentre os cinco menos similares (RB93509-RB931611) e os cinco mais similares (RB72454-RB951541) em ambas as técnicas testadas (morfológica e RAPD), o que reflete a baixa correlação encontrada (0,4698) conforme mostrado na Tabela 18.

**Tabela 16.** Valores dos coeficientes de similaridade genética através do índice de Jaccard entre 12 genótipos de cana-de-açúcar obtidos a partir de dados binários da amplificação de 11 primers através de marcadores moleculares RAPD.

Genótipos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1 RB9364	-											
2 RB931011	0,46	-										
3 RB94503	0,54	0,52	-									
4 RB93509	0,49	<b>0,42</b>	0,47	-								
5 RB72454	0,54	0,59	0,60	0,50	-							
6 RB951541	0,56	0,58	<b>0,69</b>	0,49	<b>0,69</b>	-						
7 SP79-1011	0,51	0,55	0,61	<b>0,40</b>	0,60	0,64	-					
8 RB931530	0,46	0,58	0,54	<b>0,42</b>	0,59	0,66	<b>0,67</b>	-				
9 RB92579	0,50	0,52	0,58	0,51	<b>0,68</b>	0,62	0,61	0,57	-			
10 RB931003	0,45	0,49	0,52	<b>0,35</b>	0,52	0,54	0,63	0,52	0,61	-		
11 RB961	0,48	0,53	0,54	<b>0,42</b>	0,56	0,53	0,53	0,53	0,65	0,54	-	
12 RB931611	0,47	0,49	0,50	<b>0,42</b>	0,60	0,59	0,58	0,59	0,56	0,52	0,54	-

Adotando-se novamente a distância genética média (0,54) como ponto de corte obtida entre todos os possíveis pares de genótipos a partir de RAPD, baseados também no coeficiente de Jaccard, obteve-se novamente o mesmo número de grupos (Figura 8). No entanto, seis genótipos constituíram o grupo 1 formado exclusivamente pelos mesmos genótipos do grupo 1 (RB931530, RB931611, RB93509, RB931003) (Figura 6) quando agrupados a partir de caracteres morfológicos e pelos genótipos RB72454 e SP79-1011, integrantes anteriormente do grupo 2 (Figura 6). No grupo 2, antes constituído por sete

genótipos, permaneceram os três genótipos RB951541, RB961 e RB9364 na mesma ordem. Os genótipos RB931011, RB92579 que antes faziam parte do grupo 2 passaram a fazer parte do grupo 3 juntamente com RB94503, o qual antes constituía exclusivamente o grupo 3.



**Figura 8.** Dendrograma representativo da divergência genética obtido pela técnica de agrupamento UPGMA, a partir da matriz de similaridade baseado no coeficiente de similaridade de Jaccard, considerando os 11 primers de RAPD, em relação a 12 genótipos de cana-de-açúcar.

O emprego das características morfológicas e por marcadores moleculares RAPD apresentaram considerável consistência com relação aos grupos formados, uma vez que 58,33% dos genótipos permaneceram nos mesmos grupos (G1 e G2), não migrando para outros grupos quando o agrupamento foi realizado a partir dos dados obtidos por RAPD.

A total consistência da divergência entre os caracteres morfológicos e a obtida por RAPD é bem evidente quando se considera um ponto de corte de 25% nos dendrogramas obtidos pelas duas formas de caracterização genética (Figuras 6 e 8). Nota-se que os mesmos genótipos são separados em seis pequenos grupos iguais. O grupo 1 formado pelos pares de genótipos RB931530 e RB931611, o grupo 2 constituído pelos pares RB93509 e RB931003, um terceiro grupo representado pelos três genótipos RB951541, RB961 e RB9364, um quarto grupo com RB931011 e RB92579, um quinto grupo com os genótipos RB72454 e SP79-1011 e, finalmente, o sexto e último grupo formado unicamente por

RB94503, ocorrendo apenas a mudança de ordem dos grupos formados pelos três genótipos RB951541, RB961 e RB9364 e do grupo com os pares RB72454 e SP79-1011.

#### 4.4.3 Marcadores moleculares SSR

Todos os procedimentos rápidos de extração de DNA resultam em DNA contaminado em maior ou menor grau por substâncias tais como proteínas, polissacarídeos ou mesmo compostos fenólicos oxidativos (Ferreira e Grattapaglia, 1998). Algumas amostras de DNA dos genótipos de cana-de-açúcar utilizados no presente estudo, após o final da extração apresentaram-se com coloração meio escura, possivelmente, por haver contaminação por polifenóis, o qual para resolver o problema encontrado adicionou-se ao tampão de extração PVP (polivinilpirrolidona) 1% e  $\beta$ -mercaptanol 0,5%. No entanto, algumas amostras de DNA ainda apresentavam características indesejáveis de coloração escura, realizando-se, portanto, a limpeza das amostras conforme metodologia descrita por Ferreira e Grattapaglia (1998).

Apesar de várias alternativas no sentido de se obter êxito com os locos microssatélites, dos seis locos utilizados no presente trabalho, quatro pares de iniciadores MCSA175G03, MCSA176C01, MCSA205C07 e MCS005C04 apresentaram bandas únicas e pouco visíveis. Os dois locos restantes YCS24.043 e YCS02.047 não apresentaram produtos de amplificação, apesar de mudanças no ciclo da PCR para uma pré-desnaturação de 94°C por 5 minutos, seguida de 30 ciclos, com 1 minuto a 94°C, 1 minuto de pareamento a 52°C, 1 minuto de extensão a 72°C e 7 minutos a 72°C para extensão final.

Para a obtenção de êxito em biologia molecular, faz-se necessário vários testes de ajustes em várias etapas do trabalho, que vai desde o aperfeiçoamento no isolamento de DNA até aos testes de amplificação com diversas mudanças no ciclo de PCR, em que muitas vezes são necessárias mudanças específicas com testes individuais para cada primer utilizado, o que demanda determinado tempo para se conseguir sucesso no trabalho desenvolvido, especialmente, quando se trata de microssatélites.

Dessa forma, são necessários novos testes com mudanças no ciclo de amplificação da PCR para os locos SSR utilizados, assim como aquisição de

novos locos para serem testados a fim de se obter amplificações genômicas que possibilitem a caracterização molecular individual de cada genótipo para vários genótipos de cana-de-açúcar avaliados.

#### 4.5 Relacionamento genético dos diferentes estimadores

O relacionamento entre dois genótipos pode ser definido em termos de similaridade genética. Diferentes estimadores foram utilizados neste estudo para quantificação da similaridade genética, conforme mostrado na Tabela 17.

Características morfológicas estimaram uma similaridade genética mínima de 0,34 entre o par de genótipos 3 e 4 (RB94503 e RB93509), sendo que para RAPD similaridade mínima foi similar com 0,35, no entanto ocorreu entre os genótipos 4 e 10 (RB93509 e RB931003). O mesmo ocorreu para a similaridade máxima. Para o marcador RAPD o maior valor de similaridade foi 0,69 apresentado pelos genótipos 3 e 6 (RB94503 e RB951541), enquanto para caracteres morfológicos o máximo foi de 0,88 entre os pares 6 e 10 (RB951541 e RB931003). A similaridade genética média estimada por RAPD foi praticamente igual à obtida de características morfológicas com respectivamente 0,35 e 0,54, havendo diferença apenas quanto a amplitude que foi bem maior para as características morfológicas, 0,54, enquanto para RAPD foi de 0,34, com uma diferença de amplitude de 0,20 entre as duas técnicas.

Quanto às características quantitativas, pela Distância Euclidiana Média, o menor valor foi apresentado pelo par formado pelos genótipos 5 e 8 (RB72454 e RB931530) cuja distância foi de 2,44, e o maior valor foi constituído pelos genótipos 6 e 12 (RB951541 e RB931611), com uma distância de 2,09. Já pela distância  $D_{II}^2$  de Mahalanobis o par de genótipos mais similar foi formado por 3 e 7 (RB94503 e SP79-1011) com um valor de 0,77. A maior distância foi conferida para os pares 2 e 3 (RB931011 e RB94503) com valor de 39,30, havendo

portanto uma amplitude bem elevada, separando significativamente os genótipos menos distantes dos mais distantes.

**Tabela 17.** Menores valores, maiores valores, médias e amplitude para os coeficientes de similaridade de Jaccard gerados a partir de dados morfológicos mais RAPD e através dos coeficientes de dissimilaridade para caracteres quantitativos por meio das Distâncias Euclidiana Média Padronizada e  $D_{ii}^2$  de Mahalanobis entre 12 genótipos de cana-de-açúcar analisados.

Coeficientes		Mínimo	Genótipos	Máximo	Genótipos	Amplitude	Média
Jaccard	Morfológico	0,3448	3 e 4	0,8846	6 e 10	0,5398	0,5654
	RAPD	0,3548	4 e 10	0,6949	3 e 6	0,3401	0,5418
Euclidiana Média		0,3464	5 e 8	2,4373	6 e 12	2,0909	1,3071
$D_{ii}^2$ Mahalanobis		0,7666	3 e 7	39,3018	3 e 2	38,5352	12,6035

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 17, nota-se que nenhum par de genótipos coincidiu entre os valores mínimos e máximos obtidos pelas diferentes técnicas na quantificação da divergência genética entre os genótipos avaliados. Verifica-se também que é difícil avaliar o comportamento dos coeficientes diretamente nas matrizes de similaridades, como apresentado e discutido anteriormente ou usando estatísticas como a média, o que por si já justifica o uso das técnicas de agrupamentos utilizadas no presente estudo, principalmente para verificar quais linhagens são mais parecidas entre si em relação aos demais genótipos avaliados.

As correlações entre as medidas de divergência genética utilizando o teste de Mantel (Mantel, 1967), obtidas pelos diferentes estimadores de divergência genética a partir dos caracteres quantitativos, morfológico e molecular, encontram-se inseridas na Tabela 18.

A correlação entre a estimativa da divergência genética avaliada por meio de caracteres morfológicos e a estimada por marcadores moleculares RAPD ( $r=0,4698$ ) foi altamente significativa. No entanto, devido a sua média magnitude, indica que são medidas complementares. Sendo assim, a utilização de uma estimativa não substitui a necessidade de se avaliar outra. Dessa forma, as características morfológicas utilizadas neste estudo para descrever os genótipos de cana-de-açúcar podem ser complementadas com os dados de RAPD.

Pires (1993) encontrou também moderada correlação ( $r = 0,4609$ ) obtida pelo método do coeficiente de parentesco (baseado em genealogias) e a partir de escores baseados na técnica RFLP. Resultado semelhante em cana-de-açúcar foi também obtido por Lima et al. (2002) com AFLP e também dados de genealogia, em que obtiveram uma correlação  $r = 0,42$ , sugerindo que os dados de AFLP podem ajudar quantificar o grau de relação entre cultivares de cana-de-açúcar com maior precisão.

As demais correlações entre os caracteres quantitativos obtidos pela Distância Euclidiana Média e estatística  $D_{ii}^2$  de Mahalanobis não apresentaram concordância entre caracterização morfológica e molecular, sugerindo que estes estimadores de divergência genética utilizados no presente estudo não são relacionados, sendo desta forma, medidas distintas. A ausência de correlação foi também evidenciada entre as estimativas de divergência através de caracteres quantitativos obtidas a partir Distância Euclidiana Média e a  $D_{ii}^2$  de Mahalanobis, conforme discutido anteriormente nos itens 4.3.1 e 4.3.2, o que indica claramente não existir qualquer relação entre estas duas estimativas.

**Tabela 18.** Correlação entre a divergência genética estimada através da caracterização morfológica, molecular (RAPD), Distância Euclidiana Média e estatística  $D_{ii}^2$  de Mahalanobis.

	Morfológico	RAPD	Euclidiana	Mahalanobis
Morfológico	-			
RAPD	0,4698**	-		
Euclidiana	0,1224 <sup>ns</sup>	0,1168 <sup>ns</sup>	-	
Mahalanobis	0,0904 <sup>ns</sup>	0,0987 <sup>ns</sup>	0,0254 <sup>ns</sup>	-

\*\*Significativo a 1% de probabilidade, pelo teste de Mantel.

Fica evidente, que a associação moderada encontrada pela média correlação entre as estimativas da divergência genética a partir de caracteres morfológicos e RAPD, deve estar relacionada com uma amostragem pouco representativa, devendo-se utilizar um maior número de marcadores genéticos para uma melhor representação do genoma e também, fazendo-se uso de um maior número de genótipos, podendo não provir necessariamente de delineamentos estatísticos, que poderão confirmar ou obter novas inferências.

## 5 CONCLUSÕES

---

A partir dos resultados obtidos, pôde-se chegar às seguintes conclusões:

- a) a maior parte dos caracteres apresentou coeficiente de correlação genotípica mais elevado do que os de correlação fenotípica e de ambiente, o que indica moderada influência do ambiente na expressão dos caracteres em observação;
- b) em alguns casos, as correlações de ambiente foram negativas e as genotípicas foram positivas para o caráter TCH, evidenciando que mudanças nas condições de ambiente produzem efeitos contrários deste com os demais caracteres;
- c) as três diferentes metodologias empregadas para quantificar a divergência genética através dos caracteres quantitativos e a utilizada para características morfológicas e moleculares evidenciam a existência de variabilidade genética entre os genótipos avaliados;

- d) a baixa correlação observada entre a Distância Euclidiana Média e a  $D_{ii}^2$  de Mahalanobis, e as suas inconsistências quanto à formação de diferentes grupos caracterizam estas duas estimativas como medidas de dissimilaridade distintas.
- e) as técnicas de agrupamento através do método do “Vizinho mais Distante” e por UPGMA evidenciam dispersões gráficas não coincidentes, com diferenças quanto ao número de grupos e ao padrão de agrupamento, ficando evidente a distinção entre as duas metodologias;
- f) o padrão de agrupamento obtido por UPGMA e a gerada pelo método de otimização de Tocher apresentaram a mesma concordância quanto ao número e aos grupos formados, indicando que qualquer uma destas técnicas de agrupamento pode ser utilizada para representar bem a divergência genética;
- g) a Distância Generalizada  $D_{ii}^2$  de Mahalanobis não correspondeu com a Distância Euclidiana Média Padronizada;
- h) a correlação entre a estimativa de divergência genética avaliada por meio de caracteres morfológicos e a estimada por marcadores moleculares, embora significativa, foi de média magnitude, indicando que são medidas complementares. Dessa forma, a utilização de uma não substitui a necessidade de avaliar a outra;
- i) não houve correlação para divergência obtida por características quantitativas com os caracteres morfológicos e marcadores moleculares, obtida pelos diferentes estimadores, assim como entre a Euclidiana Média Padronizada e  $D_{ii}^2$  de Mahalanobis, o que indica claramente não existir qualquer relação entre estas estimativas;

- j) a associação moderada encontrada pela correlação entre as estimativas da divergência genética a partir de caracteres morfológicos e RAPD, está relacionada com uma amostragem pouco representativa, devendo-se utilizar um maior número de marcadores genéticos para uma melhor representação do genoma e também um maior número de genótipos, que poderão confirmar ou obter novas inferências;
- k) é necessário novos testes com mudanças no ciclo da PCR para os locos SSR utilizados, assim como aquisição de novos locos para serem testados a fim de se obter resultados com esta técnica e assim, correlacioná-la com RAPD, caracteres morfológicos e quantitativos para verificar a relação entre estes diferentes procedimentos com SSR.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

ALFONSI, R. R.; PEDRO JUNIOR, M. J.; BRUNINI, O.; BARBIERI, V. Condições climáticas para cana-de-açúcar In: PARANHOS, S. B. (Coord.). **Cana-de-açúcar. Cultivo e Utilização**. Campinas: Fundação Cargill, v.1, p.42-55, 1987.

ALLARD, R. W. **Princípios do melhoramento genético das plantas**. São Paulo: Edgard Blücher, 1971. 381p.

AMARAL JR, A. T. **Análise multivariada e isoenzimática da divergência genética entre acessos de moranga (*Cucurbita maxima* Duchesne)**. 1994. 95p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG.

AMARAL JR., A. T. **Análise dialélica de betacaroteno, vitamina C, sólidos solúveis e produção e variabilidade em cultivares de tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.) via marcadores RAPD**. 1996. 145p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG.

AMORIM, E. P. **Variabilidade genética em milho doce estimada através de caracteres morfológicos, RAPD e microssatélites**. 2002. 69p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS.

ANDRADE, J. C. **Escorço histórico de antigas variedades de cana-de-açúcar.** Associação dos Plantadores de Cana de Alagoas ASPLANA, Maceió - AL, 1985. 37p.

BACCHI, O. O. S. Ecofisiologia da cana-de-açúcar. Instituto do Açúcar e do Alcool - **Programa Nacional de Melhoramento da Cana-de-açúcar/ PLANALSUCAR.** Piracicaba- SP, 1985. 20p.

BARBOSA, G. V. S.; SOUZA, A. J. R.; ROCHA, A. M. C.; SANTOS, V. P. S.; RIBEIRO, C. A. G.; BARRETO, E. J. S.; MOURA FILHO, G.; SOUZA, J. L.; FERREIRA, J. L. C.; SOARES, L.; CRUZ, M. M.; FERREIRA, P. V.; SILVA, W. C. **M. Três novas variedades RB de cana-de-açúcar.** Boletim Técnico. Rio Largo, AL, n.2, agosto, 2003. 16p.

BARBOSA, M. H. P. Divergência genética entre variedades de cana-de-açúcar cultivadas no Brasil. In: 7º Congresso Nacional da STAB. **Anais.** Londrina-PR, 1999. p.70-72.

BARBOSA, M. H. P.; BASTOS, I. T.; SILVEIRA, L. C. I.; OLIVEIRA, M. W. Análise dialéctica em cana-de-açúcar. In: 8º Congresso Nacional da STAB. **Anais.** Recife-PE, 2002. p.355-361.

BARBOSA, Z. C. A. Estimacão de parâmetros genéticos e fenotípicos em clones de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) e suas implicações no melhoramento. In: 1º Congresso Nacional da STAB. **Anais.** Maceió-AL, 1979, p.115-121.

BARRETO, E. J. S. **Avaliação da divergência genética em genótipos de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) da estação de floração e cruzamento Serra do Ouro.** 2004. 48p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Alagoas, Rio Largo-AL.

BEHL, R. K.; SING, V. P.; PARODA, R. S. Genetic divergence in relation to heterosis and specific combining in triticale. **Indian Journal of Genetic & Plant Breeding**, New Delhi, v.45, n.2, p.368-375, 1985.

BENIN, G.; CARVALHO, F. I. F.; OLIVEIRA, A. C.; MARCHIORO, V. S.; LORENCETTI, C.; KUREK, A. J.; SILVA, J. A. G.; CRUZ, P. J.; HARTWIG, I.; SCHMIDT, D. A. M. Comparações entre medidas de dissimilaridade e estatísticas multivariadas como critérios no direcionamento de híbridos em aveia. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.33, n.4, p.657-662, 2003.

BORÉM, A. **Hibridação artificial de plantas**. Viçosa: UFV, 1999. 546p.

BORÉM, A.; SANTOS, F. R. **Biotecnologia Simplificada**. Viçosa: UFV, 2 ed., rev. e ampl., 2004. 302p.

BOTSTEIN, D.; WHITE, R. L.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R. W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **American Journal of Human Genetics**, v.32, p.314-331, 1980.

CLEMENTS, H. F. **Sugarcane crop logging and crop control: principles and practices**. The University Press of Hawaii, Honolulu, 1980. 520p.

COLLARES, E. A. S.; CHOER, E.; PEREIRA, A. S. Characterization of potato genotypes using molecular markers. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.39, n.9, p.871-878, 2004.

COPERSUCAR, **Relatório anual de atividades 1996/1997**. 1997. 80p.

CORTE-BRILHO, F. F.; GIRARD, G. C. L.; CALHEIROS, G. G. **Treinamento de especialização sobre a cultura da cana-de-açúcar para agrônomos: Melhoramento**. IAA/PMGCA-Coordenadoria Regional Nordeste, Maceió-AL, 1981. 30p.

COX, M. C.; HOGARTH, D. M. Progress and changes in the South Queensland variety selection program. **Proceedings of Australian Society of Sugar Cane Technologists**, p.251-255, 1993.

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.

CRUZ, C. D. **Aplicação de algumas técnicas multivariadas no melhoramento de plantas**. 1990. 188p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP.

CRUZ, C. D. **Programa Genes: aplicativo computacional em genética e estatística**. Viçosa: UFV, 2001. 648p.

CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. J.; CARNEIRO, P. C. S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa: UFV, 3. ed., v.1, 2004. 480p.

CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. J. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa: UFV, 2 ed. Revisada, 2001. 390p.

DILLEWIJN, C. **Botany of sugarcane**. Waltran: Chromic Botanica. 1952. 371p.

DUARTE, J. M.; SANTOS, J. B.; MELO, L. C. Genetic divergence among common bean cultivars from different races based on RAPD markers. **Genetic and molecular biology**, Ribeirão Preto, v.22, n.3, p.419-426, 1999.

EVERITT, B. **Cluster analysis**. London, Heinemann Educational Books, 1977. 122p.

FALCONER, D. S. **Introdução à genética quantitativa**. Trad. SILVA, M. A. e SILVA, J. C. Viçosa: UFV, 1987. 279p.

FAUCONNIER, R.; BASSEREAU, D. **La cana de azúcar**. Técnicas agrícolas y producciones tropicales. Barcelona: Blume, 1975. 433p.

FEDERIZZI, L.C. Estrutura de um programa de melhoramento de plantas e possíveis aplicações de marcadores moleculares: visão do melhorista. In: MILACH, S.C.K. **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre: UFRGS, p.3-15. 1998.

FERNANDES, A. C. Produção e produtividade da cana-de-açúcar no Brasil. In: 6º Congresso Nacional da STAB, **Anais**. Maceió-AL, 1996. p.602-612.

FERNANDES, A. J. **Manual da cana-de-açúcar**. Piracicaba: Livroceres, 1984. 196p.

FERREIRA, D. F. **Sisvar: Programa estatístico versão 4.3 (build 46)**. Dex/UFLA, 1999-2003.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3.ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. p.220. (EMBRAPA-CENARGEN. Documentos, 20).

FINNEY, D. O. Multivariate analysis and agricultural experiments. **Biometrics**. Raleigh, v.12, n.1, p. 67-71, 1956.

GOODMAN, M. M. The races of maize. II. Use of multivariate analysis of variance to measure morphological similarity. **Crop Science**, Madison, v.8, n.6, p.693-698, 1968.

GRAHAM, G. C.; MEYERS, P.; HENRY, R. J. A simplified method for preparation of fungal genomic DNA for PCR and RAPD analysis. **BioTechniques**, v.16, n.1, p.48-50, 1994.

HAIR JR., J. F.; ANDERSON, R. E.; TATHAM, R. L.; BLACK, W. C.; trad. Sant'Anna, A. S.; NETO, A. C. **Análise multivariada de dados**. Porto Alegre: Bookman, 5. ed., 2005. 593p.

HAMADA, H.; PETRINO, M.C.; TAKUGANA, T. A novel repeated element with Z-forming potential is widely found in evolutionarily diverse eukaryotic genomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**, v.79, p.6465-6469, 1982.

HOGARTH, D. M. Genetics of sugarcane. In: Heinz, D. J. **Sugarcane improvement through breeding**. Elsevier, Amsterdam, p.255-271, 1987.

HOGARTH, D. M.; COX, M. C.; BULL, J. K. Sugarcane improvement: Past achievements and future prospects. In: **Crop improvement for the century**, p.29-56, 1997.

HUDCOVICOVÁ, M.; KRAIC, J. Utilisation of SSRs for characterisation of the soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) genetic resources. **Czech Journal of Genetics and Plant Breeding**, v.39, p.120-126, 2003.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. Disponível em [www.ibge.gov.br](http://www.ibge.gov.br). Acessado em 25 de março de 2006.

JACCARD, P. Nouvelles recherches sur la distribution florale. **Bulletin of Society Vaudusiana National**, v.44, p.223-270, 1908.

JAMES, N. I. Yield components in random and selected sugarcane populations. **Crop Science**. Madson, v.11, p. 906-908, 1971.

JATASRA, D.; PARODA, R. Genetic divergence in wheat. **Indian Journal of Genetics & Plant Breeding**, New Delhi, v.43, n.1, p. 63-67, 1983.

KANG, M. S.; MILLER, J. D.; TAI, P. Y. P. Genetic and phenotypic path analysis and heritability in sugarcane. **Crop Science**, Madison, v.23, p.643-647, 1983.

KULCHESKI, F. R.; MUSCHNER, V. C.; LORENZ-LEMKE, A. P.; STEHMANN, J. R.; BONATTO, S. L.; SALZANO, F. M.; FREITAS, L. B. Molecular phylogenetic analysis of *Petunia* Juss. (Solanaceae). **Genetics**, v.126, n.1, p.3-14, 2006.

LIMA M. L .A; GARCIA A.A. F.; OLIVEIRA, K. M.; MATSUOKA, S.; ARIZONO, H.; SOUZA JR, C. L.; SOUZA, A. P. Analysis of genetic similarity detected by AFLP and coefficient of parentage among genotypes of sugar cane (*Saccharum* spp.). **Theoretical and Applied Genetics**, v.104, n.1, p.30-8, 2002.

LIMA, L. F. N.; BARBOSA, G. V. S. Avaliação técnica da safra agrícola 95/96 da Usina Caeté. In: 6º Congresso Nacional da STAB, **Anais**. Maceió-AL, 1996. p.595-601.

LITT, M.; LUTY, J.A. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a nucleotide repeat within the cardiac muscle action gene. **American Journal of Human Genetics**, v.44, p.398-401, 1989.

LOPES, A. C. A.; FILHO, F. R. F.; SILVA, R. B. Q.; CAMPOS, F. L.; ROCHA, M. M. Variabilidade e correlações entre caracteres agronômicos em caupi (*Vigna unguiculata*). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.36, n.3, p.515-520, 2001.

LOPES, C. H. Influência do tamanho dos cristais de açúcar em qualidade. **Brasil Açucareiro**, v. 103, nºs - 2 e 3, mar./abr./mai./jun, Rio de Janeiro, p.5-8, 1985.

LUCCHESI, A. A. **Processos fisiológicos da cultura da cana-de-açúcar**. Boletim Técnico: 7, Piracicaba-SP, 1995. 50p.

MACHADO JR., G. R. **Sugarcane variety notes**, “na international directory”, 7th Revision. Piracicaba-SP, fev., 2001. 132p.

MAGALHÃES, A. C. N. Ecofisiologia da cana-de-açúcar: aspectos do metabolismo do carbono na planta. In: CASTRO, P.R.C.; FERREIRA, S.O.; YAMADA, T.; (Coord.). **Ecofisiologia da produção**. Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato, p.113-118, 1987.

MAHALANOBIS, P. C. On the generalized distance in statistic. **Proc. Nat. Ins. Sci.**, v.2, p.49-55, 1936.

MANTEL, N. The detection of disease clustering and generalized regression approach. **Cancer Research**, Birmingham, v.27, n.2, p.209-220, 1967.

MARRIOTT, F. H. C. **The interpretation of multiple observations**. New York, Academic Press, 1974. 117p.

MATSUOKA, M.; SATO, M.; TAMURA, Y.; TANIO, M.; SUWABE, K.; FUKUOKA, H. Microsatellite markers for cultivar identification in sugarcane (*Saccharum* spp.). In: XXV ISSCT. **Proceedings**, v.2, Atagua-Guatemala city, 2005. p.597-601.

MATSUOKA, S.; GARCIA, A. A. F.; CALHEIROS, G. G. Hibridação em cana-de-açúcar. In: BORÉM, A. (Org.). **Hibridação artificial em plantas**. Viçosa: UFV, 221-254 p, 1999a.

MATSUOKA, S.; GARCIA, A. A. F.; ARIZONO, H. Melhoramento da cana-de-açúcar. In: BORÉM, A. (Org.) **Melhoramento das espécies cultivadas**. Viçosa, MG: Editora Universidade Federal de Viçosa, p. 204-251, 1999b.

MELO, W. M. C.; PINHO, R. G. V.; FERREIRA, D. F. Capacidade combinatória e divergência genética em híbridos comerciais de milho. **Ciência & Agrotecnologia**, lavras, v.25, n.4, p.821-830, 2001a.

MINGOTI, S. A. **Análise de dados através de métodos de estatística multivariada: uma abordagem aplicada**. Editora UFMG, 2005. 297p.

MIRANDA, J. E. C.; CRUZ, C. D.; COSTA, C. P. Predição do comportamento de híbridos de pimentão (*Capsicum annuum* L.) pela divergência genética dos progenitores. **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v.11, n.4, p.929-937, 1988.

MOURA, M. M. **Estimativas de parâmetros genéticos de caracteres industriais em híbridos de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp)**. 1990. 137p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife-PE.

OLIVÉRIO, J. L. Evolução tecnológica do setor sucroalcooleiro: a visão da indústria de equipamentos. In: 8º Congresso Nacional da STAB, **Anais**. Recife-PE, 2002. p.737-745.

PANDEY, G.; DOBHAL, V. K. Multivariate analysis in taro (*Colocasia esculenta* L.). **Indian Journal of Genetics & Plant Breeding**, New Delhi, v.57, n.3, p.262-265, 1997.

PEIXOTO, T. C. **Estudo complementar ao melhoramento genético da cana-de-açúcar**. Piracicaba, 1986. 119p.

PEREIRA, J. J.; CRUZ, C. D. Comparação de métodos de agrupamento para o estudo da diversidade genética de cultivares de arroz. **Revista Ceres**, v.50, n.287, p.41-60, 2003.

PIRES, C. E. L. S. **Diversidade genética de variedades de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) cultivadas no Brasil.** 1993. 120p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP.

PUNIA, M. S.; HOODA, R. S.; PARODA, R. S. Discriminant function analysis for cane-yield attributes in sugarcane. **Indian Journal of Agricultural Sciences**, New Delhi, v.52, n.10, p.643-645, 1982.

QUEME, J. L.; MOLINA, L.; MELGAR, M. Analysis of genetic similarity among 48 sugarcane varieties using microsatellite DNA sequences. In: XXV ISSCT. **Proceedings**, v.2, Atagua-Guatemala city, 2005. p.592-596.

**QUIRINO, M. S.** Polimorfismos de seqüência nucleotídica em fragmentos genômicos de cana-de-açúcar homólogos a genes de resistência. **Piracicaba, 2003. 52p. Dissertação (Mestrado)** - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP.

RAO, C.R. **Advanced statistical methods in biometric research.** New York: Jonh Wiley and Sons. 1952. 390p.

RAVEEDRAN, T. S.; APPADURAI, R. Genetic divergence and heterosis in pearl millet. **Indian Journal of Agricultural Sciences**, New Delhi, v.54, n.10, p.888-893, 1984.

REGO, F. L. H.; COSTA, R. B.; CONTINI, A. Z.; MORENO, R. G. S.; RONDELLI, K. G. S. Variabilidade genética e estimativas de herdabilidade para o caráter germinação em matrizes de *Albizia lebbbeck*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.35, n.5, p.1209-1212, 2005.

RITSCHER, P. S.; HUAMÁN, Z. Variabilidade morfológica da coleção de germoplasma de batata-doce da Embrapa - Centro Nacional de Pesquisa de Hortaliças. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.37, n.4, p.485-492, 2002.

ROACH, B. T.; DANIELS, J. A review of the origin and improvement of sugarcane. In: COPERSUCAR. **Copersucar International Sugarcane Breeding Workshop**. Piracicaba, 1987. p.1-31.

RODRIGUES, L. S.; ANTUNES, I. F.; TEIXEIRA, M. G.; SILVA, J. B. Divergência genética entre cultivares locais e cultivares melhoradas de feijão. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.37, n.9, p.1275-1284, 2002.

RUAS, D. G. Setor agroindustrial açucareiro: alguns dados das safras 1979/80 a 1982/83. **Cadernos Planalsucar**, nº 3, Piracicaba, p.3-11, 1984.

RUAS, T. S. P. M.; RUAS, C. F.; DINIZ, L. E. C.; CARVALHO, V. P.; RAMPIM, L.; RUAS, E. A.; SILVEIRA, S. R. Genetic polymorphism among 14 elite *Coffea arabica* L. cultivars using RAPD markers associated with restriction digestion. **Genetics and Molecular Biology**, v.26, n.1, p.59-64, 2003.

SAMAL, K. M.; JAGADEV, E. N. Genetic divergence among chickpea cultivars. **Indian Journal of Genetics & Plant Breeding**, New Delhi, v.56, n.1, p.86-88, 1996.

SANGUINETTI, C.; DIAS-NETO, E.; SIMPSON, A.J.G. RAPD silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. **Biotechniques**, v.17, p.914-921, 1994.

SANTOS, C. A. E.; MENEZES, E. A.; ARAÚJO, F. E D. Divergência genética em acessos de guandu. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.29, n.11, p.1723-1726, 1994.

SANTOS, C. A. E.; OLIVEIRA, C. A. V.; MENEZES, E. A. Seleção de descritores na caracterização e avaliação preliminar de germoplasma de guandu. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.30, n.7, p.971-975, 1995.

SCHÄFER, G.; BASTIANEL, M.; DORNELLES, A. L. C. Diversidade genética de porta-enxertos cítricos baseada em marcadores moleculares RAPD. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.34, n.5, p.1437-1442, 2004.

SCOTT, A. J.; KNOTT, M. A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, North Carolina, v.30, n.3, p.507-512, 1974.

SELVI, A.; NAIR, N. V.; NOYER, J. L.; SINGH, N. K.; BALASUNDARAM, N.; BANSAL, K. C.; KOUNDAL, K. R.; MOHAPATRA, T. Genomic constitution and genetic relationship among the tropical and subtropical Indian sugarcane cultivars revealed by AFLP. **Crop Science**, Madison, v.45, p.1750-1757. 2005.

SILVA, C. M.; GONÇALVES-VIDIGAL, M. C.; FILHO, P. S. V.; SCAPIM, C. A.; DAROS, E.; SILVÉRIO, L. Genetic diversity among sugarcane clones *Saccharum* spp.). **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v.27, n.2, p.315-319, 2005.

SILVA, C. M.; GONÇALVES-VIDIGAL, M. C.; SCAPIM, C. A.; DAROS, E.; SILVÉRIO, L. Divergência genética em clones de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.). In: 8º Congresso Nacional da STAB, **Anais**. Recife-PE, 2002. p.393-398.

SILVA, E. C.; FERREIRA, D. F.; BEARZOTI, E. Avaliação do poder e taxas de erro tipo I do teste de Scott-Knott por meio do método de Monte Carlo. **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v.23, n.3, p.687-696, 1999.

SILVA, J. A. G. Uso dos genes da cana-de-açúcar como marcadores moleculares. **Revista STAB**, v.19, n.3, p.22, 2001.

SILVA, J. W. **Correlações canônicas e análise por componentes principais e variáveis canônicas de caracteres agroindustriais em cana-de-açúcar**. 2006. 43p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Alagoas, Rio Largo-AL.

SILVA, M. P.; JÚNIOR, A. T. A.; PEREIRA, M. G.; RODRIGUES, R.; DAHER, R. F.; POSSE, S. C. P. Diversidade genética e identificação de híbridos por marcadores RAPD em feijão-de-vagem. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v.27, n.3, p.531-539, 2005.

SIMMONDS, N. W. Sugarcane. In: **Evolution of crop plants**. London, Longman Group Limited, p.104-108. 1979.

SINGH, D. The relative importance of characters affecting divergence. **Indian Journal of Genetics and Plants Breeding**, New Delhi, v.41, n.2, p.237-245, 1981.

SINGH, Y. P.; KUMAR, A.; CHAUHAN, B. P. S. Genetic divergence in pearl millet. **Indian Journal of Genetics & Plant Breeding**, New Delhi, v.41, n.1, p.186-190, 1981.

SKINNER, J. C.; HOGARTH, D. M.; WU, K. K. Selection methods, criterion and indices. In Heinz, D.J. (Editor), Sugarcane improvement through breeding Amsterdam: **Elsevier**, p. 409-453, 1987.

SMITH, J. S. C.; SENIOR, M. L. The utility of simple sequence repeat (SSR) data to preferentially identify progeny lines of maize (*Zea mays* L.) that are bred from known inbred parents. **Maydica**, Bergamo, v.45, n.3, p.205-213, 2000.

SNEATH, P.H.; SOKAL, R.R. **Numerical Taxonomy**: The principles and practice of numerical classification. San Francisco: W.H. Freeman, 1973. 513p.

SOARES, L. **Melhoramento de batata-baroa (*Arracacia xanthorrhiza Bancroft*): divergência genética entre clones com base em procedimentos multivariados e estimativas de parâmetros genéticos**. 1991. 75p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG.

SOUZA, E.; SORRELLS, M. E. Relationship among 70 North American oat germoplasma: I. Cluster analysis using quantitative characters. **Crop Science**, Madison, v.31, n.3, p.599-605, 1991a.

SOUZA, E.; SORRELLS, M. E. Relationship among 70 North American oat germoplasma: II. Cluster analysis using quantitative characters. **Crop Science**, Madison, v.31, n.3, p.606-612, 1991b.

SOUZA, S. A. C. D. **Avaliação da variabilidade genética em *musa* spp. utilizando marcadores microssatélites**. 2002. 86p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP.

STEBBINS, G.K. **Processes of organic evolution**. New York: Longman, 1971. 339p.

TAI, P. Y. P.; MILLER, J. D.; LEGENDRE, B. L. Evaluation of the world collection of *Saccharum spontaneum* L. In: XXII Congress ISSCT, **Proceedings**, v.2, Colombia, 1995, p.250-259.

TATINENI, V.; CANTRELL, R. G.; DAVIS, D. D. Genetic diversity in elite cotton germoplasm determined by morphological and RAPDs. **Crop Science**, Madison, v.36, n.2, p.186-192, 1996.

ÚNICA, <http://www.portalunica.com.br/portalunica/index.php>. (02 Março de 2006).

VIANA, J. M. S. **Divergência genética, estabilidade e adaptabilidade de clones de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.)**. 1990. 108p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG.

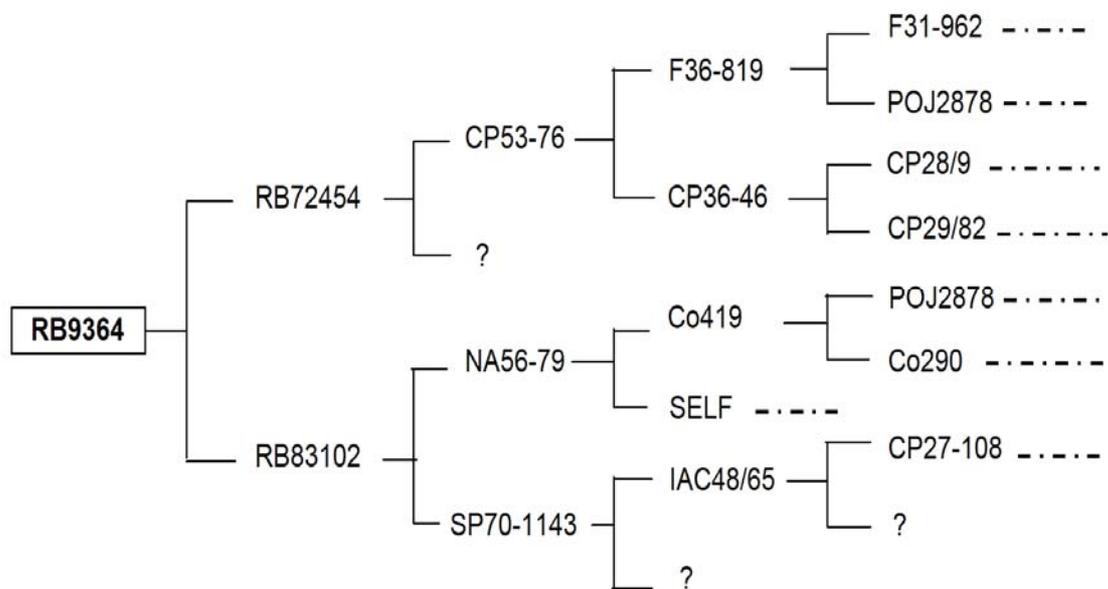
VIDOR, M. A.; RUIZ, C. P.; MORENO, S. V.; FLOSS, P. A. Marcadores moleculares em estudos de caracterização de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St.Hil.): o sabor. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.32, n.3, p.415-420, 2002.

WILCHES, O. M. Evaluación de treinta y cuatro variedades de maní mediante técnicas multivariadas. **Revista Instituto Colombiano Agropecuario**, Bogotá, v.18, n.1, p.67-76, 1983.

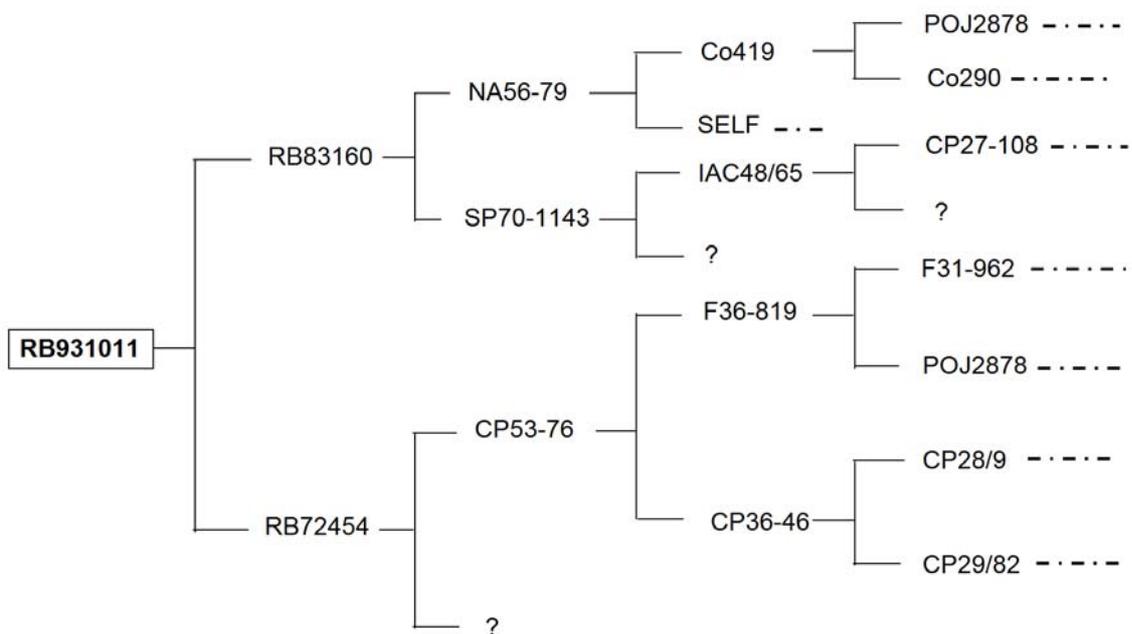
WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIC, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v.18, p.6531-6535, 1990.

ZUCCHI, M. I.; VIEIRA, M. L. C.; ARIZONA, H. Uso de RAPD na análise da variação somaclonal de cana-de-açúcar. In: 6º Congresso Nacional da STAB, **Anais**. Maceió-AL, 1996. p.282-286.

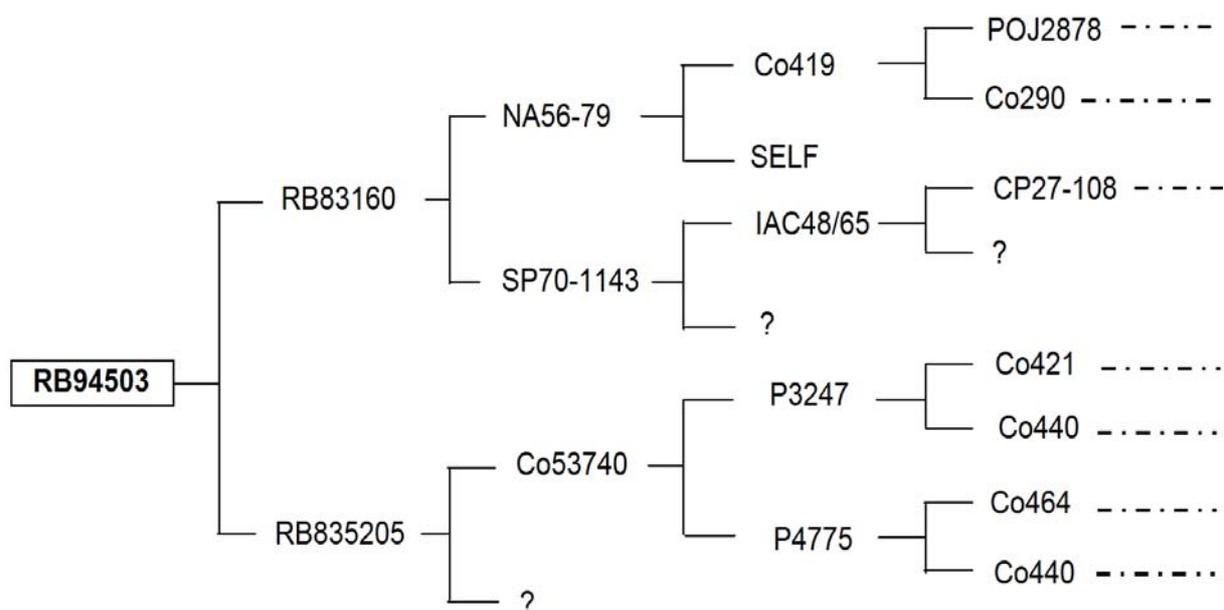
## **A N E X O S**



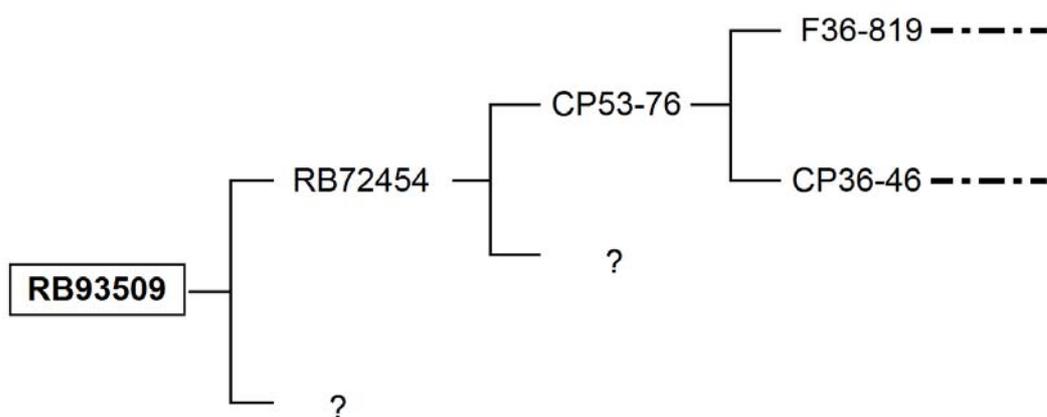
**Figura A.** Genealogia do genótipo de cana-de-açúcar RB9364.



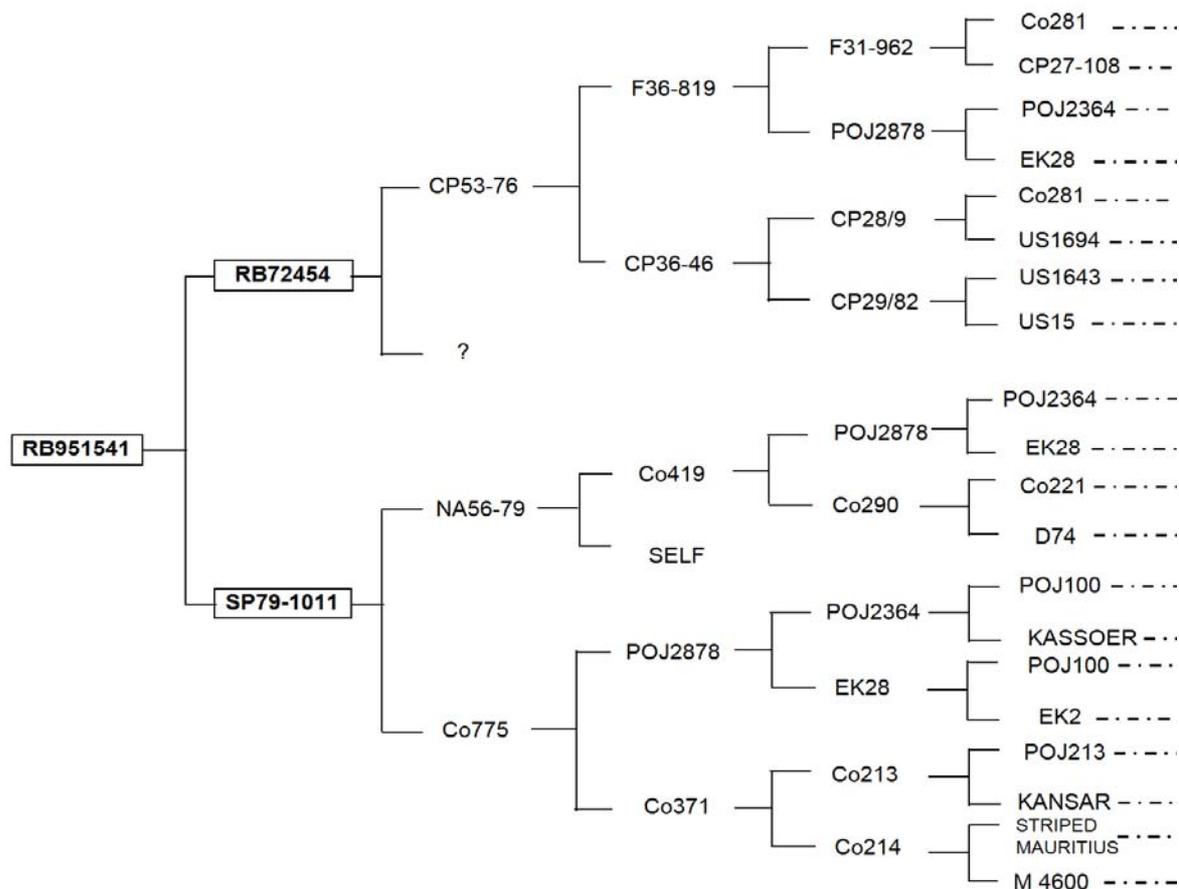
**Figura B.** Genealogia do genótipo de cana-de-açúcar RB931011.



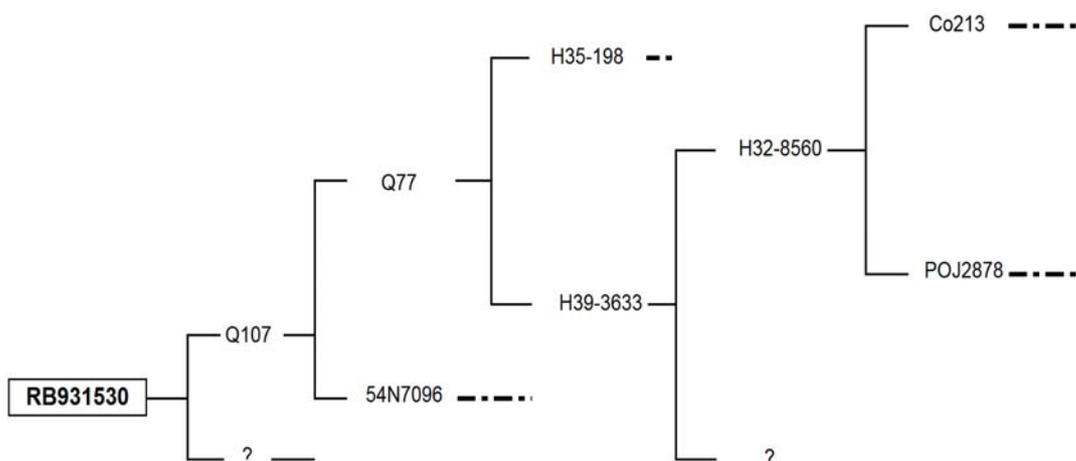
**Figura C.** Genealogia do genótipo de cana-de-açúcar RB94503.



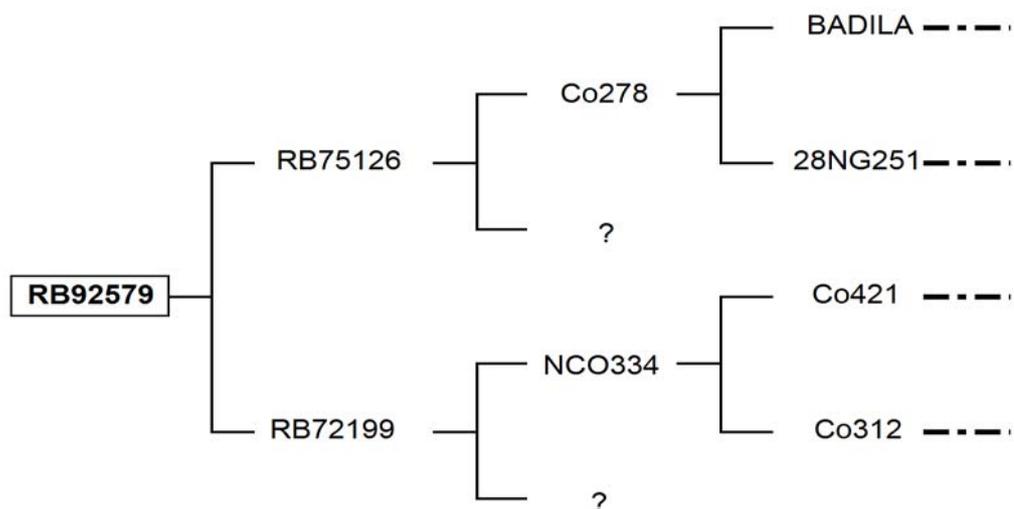
**Figura D.** Genealogia do genótipo de cana-de-açúcar RB93509.



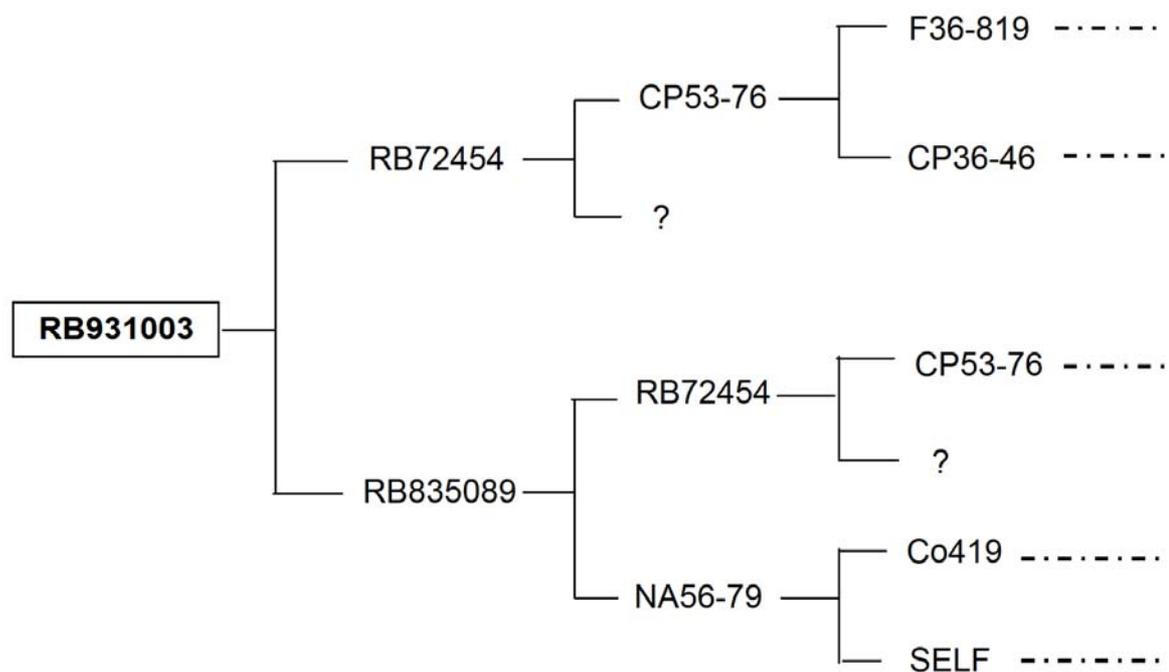
**Figura E.** Genealogias dos genótipos de cana-de-açúcar RB72454, SP79-1011 e RB951541.



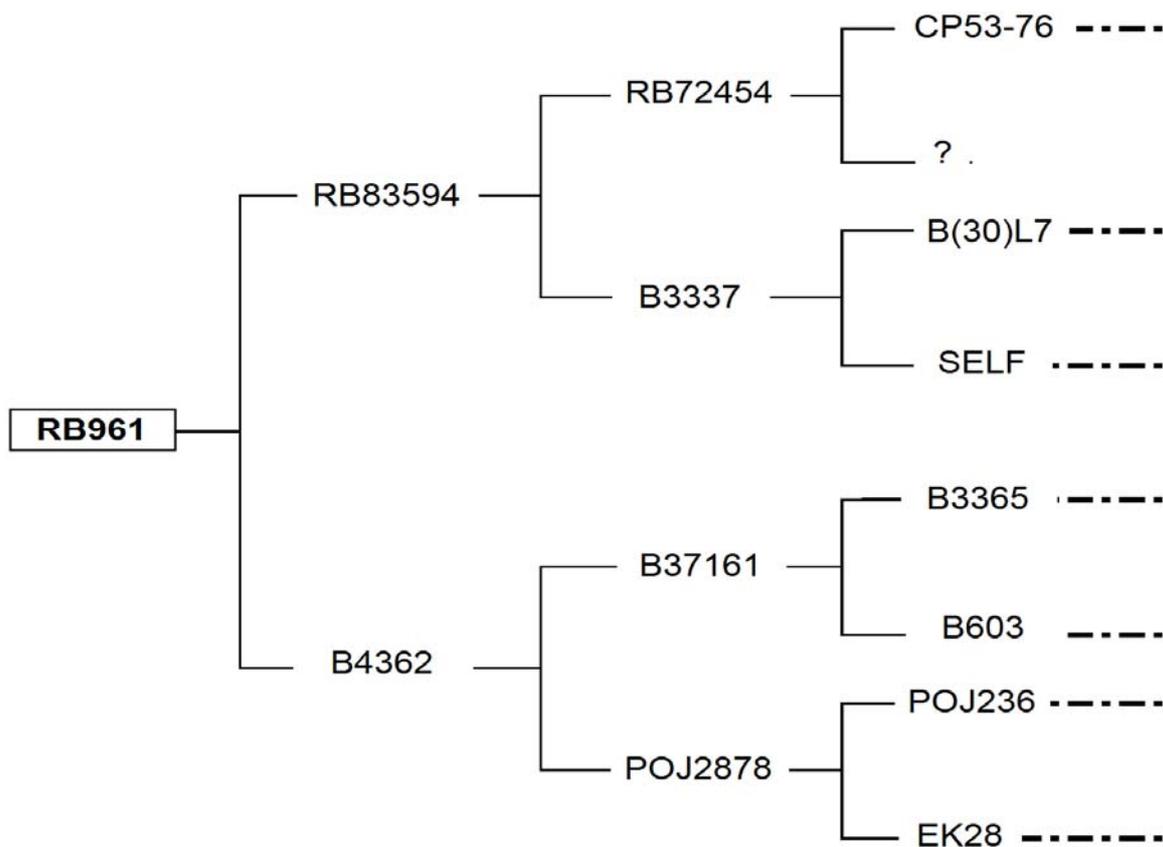
**Figura F.** Genealogia do genótipo de cana-de-açúcar RB931530.



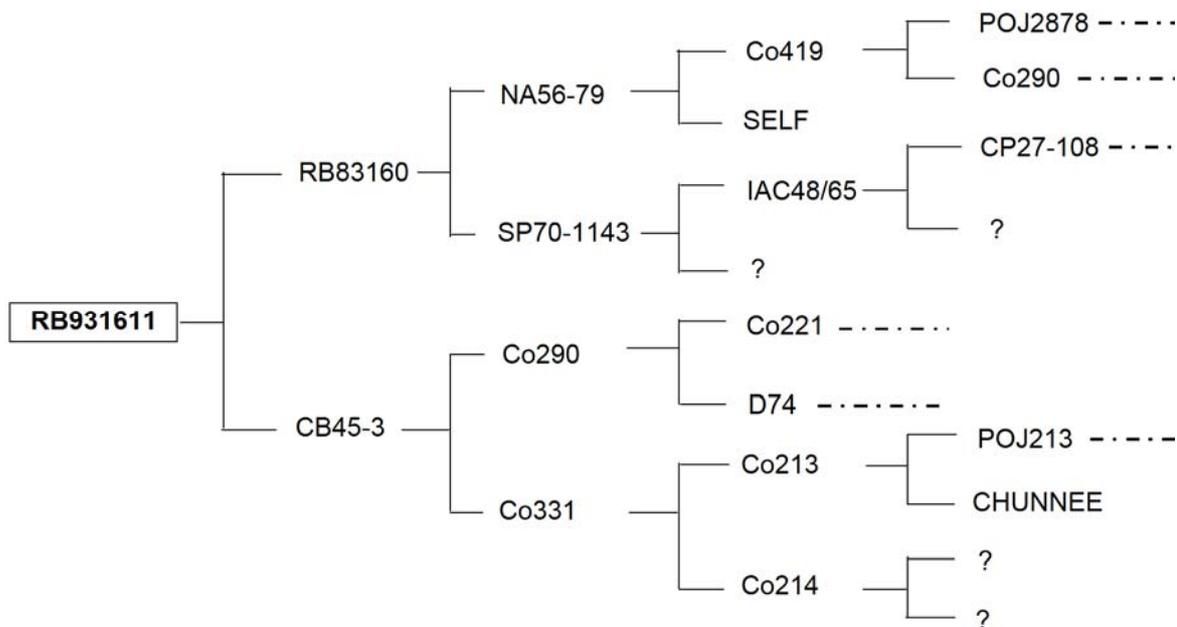
**Figura G.** Genealogia do genótipo de cana-de-açúcar RB92579.



**Figura H.** Genealogia do genótipo de cana-de-açúcar RB931003.



**Figura I.** Genealogia do genótipo de cana-de-açúcar RB961.



**Figura J.** Genealogia do genótipo de cana-de-açúcar RB931611.

## APÊNDICES



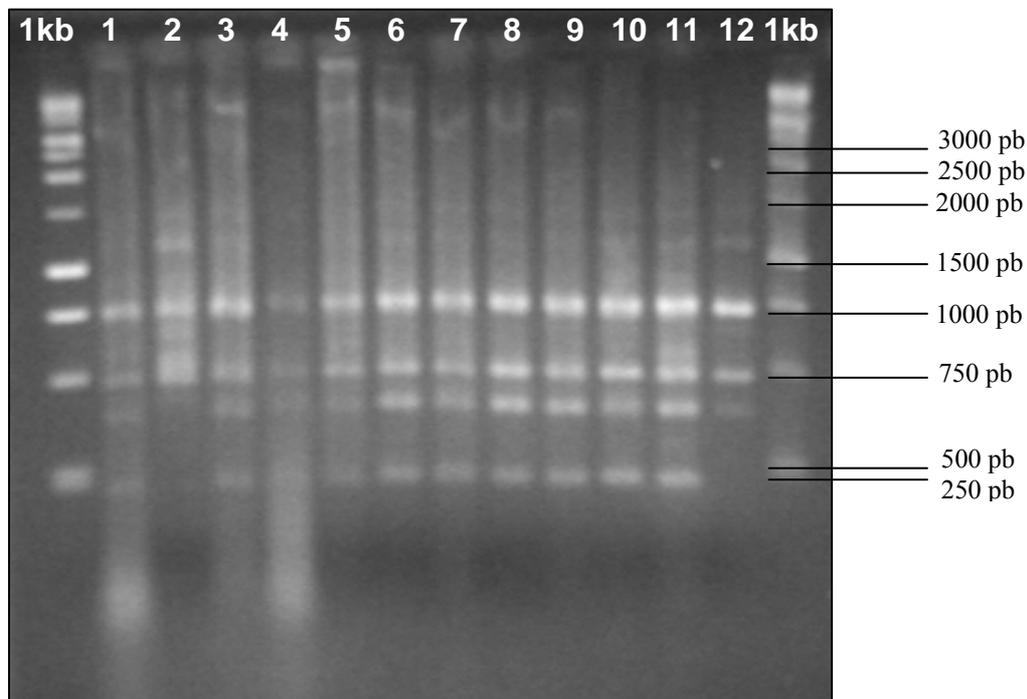
**Apêndice 1.** (Cont.) Características qualitativas consideradas para o estudo de divergência genética em cana-de-açúcar, avaliadas com 10 meses, exceto brotação, perfilhamento e desenvolvimento, avaliados com dois meses

CARACTERES	DESCRIÇÃO	Código	1-RB9364	2-RB931011	3-RB94503	4-RB93509	5-RB72454	6-RB951541	7-SF79-1011	8-RB931530	9-RB92579	10-RB931003	11-RB961	12-RB931611
GEMA	17. Saliência das gemas no nó	Pouca	1	1	1		1	1			1	1		
		Média	3	3		3			3	3			3	3
		Muita	5											
	18. Inserção da gema em relação ao anel de crescimento	Nunca ultrapassa	1		1	1	1	1	1				1	1
Ocasional. ultrap.		2	2						2	2	2			
Sempre ultrapassa		3											2	
19. Posição do poro da gema	Apical	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	Sub apical	2												
20. Distribuição de pêlos nas gemas	Ausentes	1			1					1				
	Na base	2												
	No ápice	3	3	3	3		3	3	3		3	3	3	
	Em torno	4												
FOLHA	21. Largura do limbo	Estreitas	3		3							3	3	
		Médias	5	5	5		5	5	5	5	5		5	
		Largas	7											
	22. Pêlos no bordo do limbo	Ausentes	1			1				1				
		Poucos	3	3	3	3		3	3	3		3	3	
		Muitos	5											
	23. Serrilhamento do bordo	Fraco	1	1		1			1	1	1	1	1	
Médio		3		3	3		3	3		3		3		
Forte		5												
24. Volume da copa foliar	Rala	3		3										
	Regular	5	5	5		5	5	5	5	5	5	5		
	Densa	7												
25. Tonalidade da copa foliar	Clara	3	3							3		3		
	Intermediária	5		5	5	5	5	5	5		5	5		
	Escura	7												
26. Tamanho da aurícula	Pequena	1	1	1		1	1	1	1		1	1		
	Média	3		3						3				
	Grande	5												
27. Formato do cotovelo	Lanceolado	1												
	Gola	2												
	Normal	3			3		3				3			
	Retangular	4												
	Triangular	5	5	5	5		5		5	5	5	5		
	Degrau em corte	6												
	Degrau em cunha	7												
	Degrau curvo	8												
	Degrau sinuoso	9												
BAINHA	28. Posição da pilosidade	Ausente	1		1		1			1	1			
		Dorsal	2	2		2	2		2	2		2	2	
		Lateral	3											
		Ambos	4											
PALMITO	29. Presença de cera	Ausente	1											
		Fraca	3		3		3	3		3	3	3	3	
		Regular	5	5	5		5		5					
	30. Comprimento	Intensa	7											
		Curto < 50 cm	1	1		1	1	1	1	1	1	1	1	
		Médio 50 – 65 cm	2		2	2							2	
31. Seção transversal	Longo > 65 cm	3												
	Circular	1	1	1	1		1	1	1	1	1	1		
	Oval	2			2									

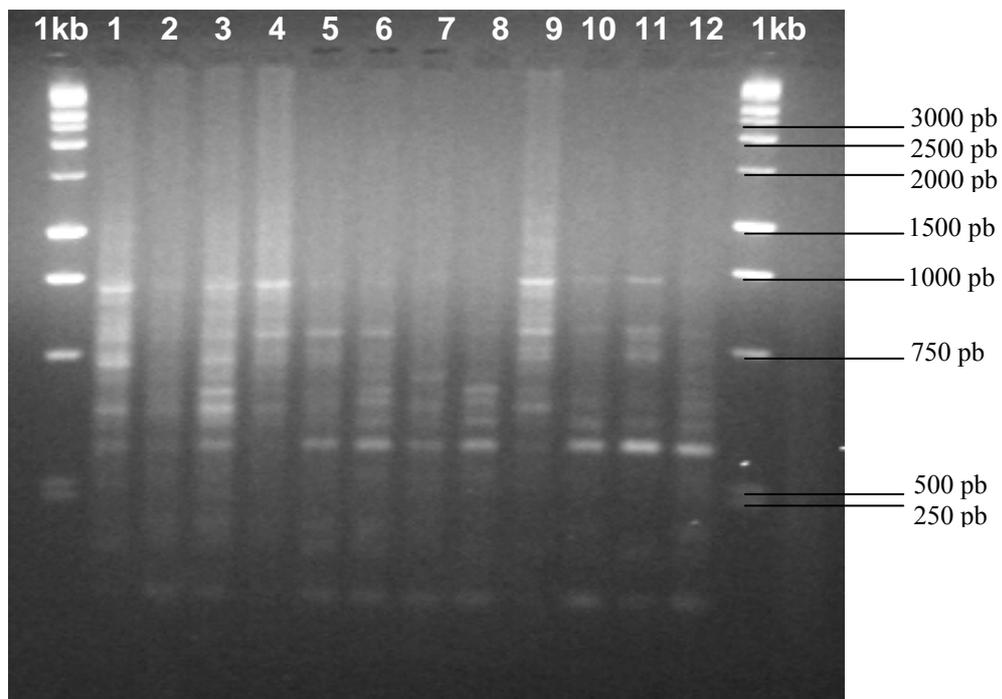
**Apêndice 2.** Matriz binária obtida a partir dos 31 caracteres morfológicos de cana-de-açúcar considerados em estudo.

Caracteres qualitativos	Hábito de crescimento	Brotação	Desenvolvimento	Perfilhamento	Comprimento dos entrenós	Diâmetro dos entrenós	Formato de entrenós	Tipos de rachaduras nos entrenós	Disposição entrenós no colmo em ziguezague	Aspecto dos entrenós	Canaleta da gema	Quantidade de cera no entrenó	Saliência do anel de crescimento do nó	Cor do primórdio radicular, sob a palha	Largura da zona radicular do nó	Enraizamento aéreo na zona radicular do nó	Saliência das gemas no nó	Inserção da gema em relação ao anel de crescimento	Posição do poro da gema	Distribuição de pêlos nas gemas	Largura do limbo	Pêlos no bordo do limbo	Serrilhamento do bordo	Volume da copa foliar	Tonalidade da copa foliar	Tamanho da aurícula	Formato do cotovelo	Posição da pilosidade	Presença de cera no palmito	Comprimento do palmito	Seção transversal do palmito	
<b>Genótipos</b>																																
RB9364	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1
RB931011	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1
RB94503	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	
RB93509	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0
RB72454	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1
RB951541	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1
SP79-1011	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
RB931530	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1
RB92579	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1
RB931003	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1
RB961	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	1
RB931611	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1

**Apêndice 3.** Produtos de RAPD obtidos a partir dos oligonucleotídeos OPA 1 e OPA 2, para os 12 genótipos de cana-de-açúcar considerados em estudo. 1kb-marcador 1kb Ladder, 1-RB9364, 2-RB931011, 3-RB94503, 4-RB93509, 5-RB72454, 6-RB951541, 7-SP79-1011, 8-RB931530, 9-RB92579, 10-RB931003, 11-RB961, 12-RB931611.

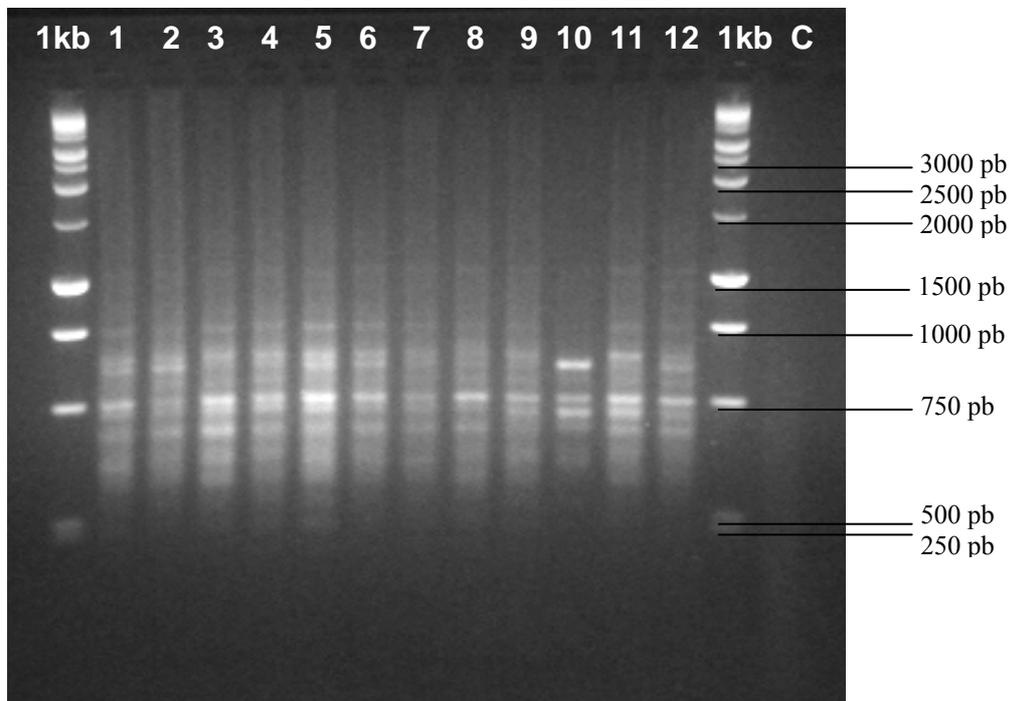


**OPA 1**

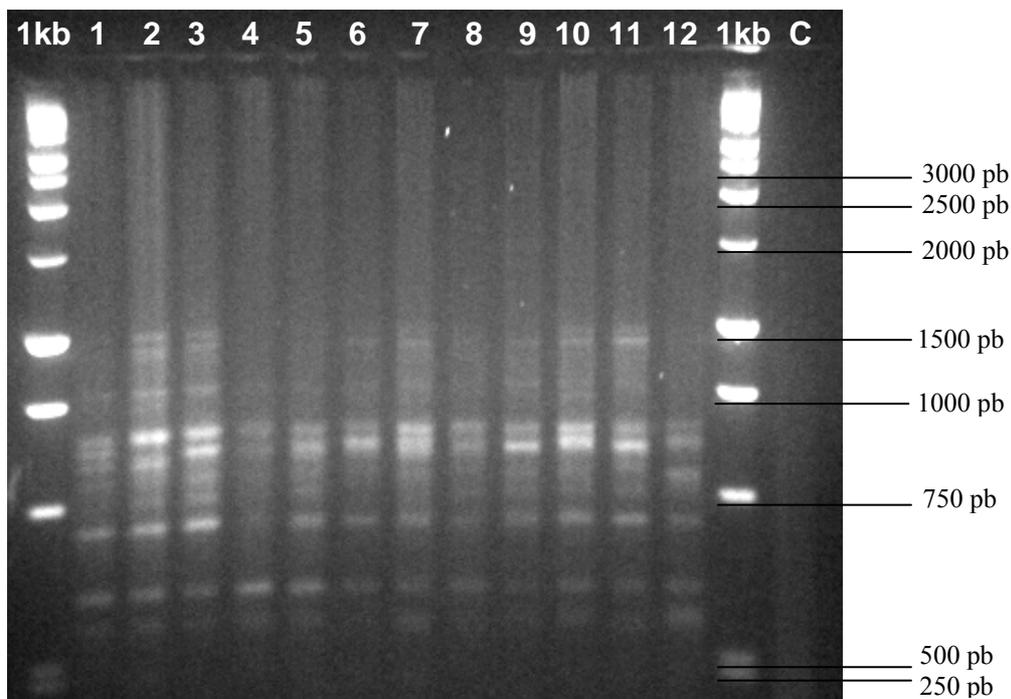


**OPA 2**

**Apêndice 3.** (Cont.) Produtos de RAPD obtidos a partir dos oligonucleotídeos OPA 3 e OPA 4, para os 12 genótipos de cana-de-açúcar considerados em estudo. 1kb-marcador 1kb Ladder, C-amostra controle, 1-RB9364, 2-RB931011, 3-RB94503, 4-RB93509, 5-RB72454, 6-RB951541, 7-SP79-1011, 8-RB931530, 9-RB92579, 10-RB931003, 11-RB961, 12-RB931611.

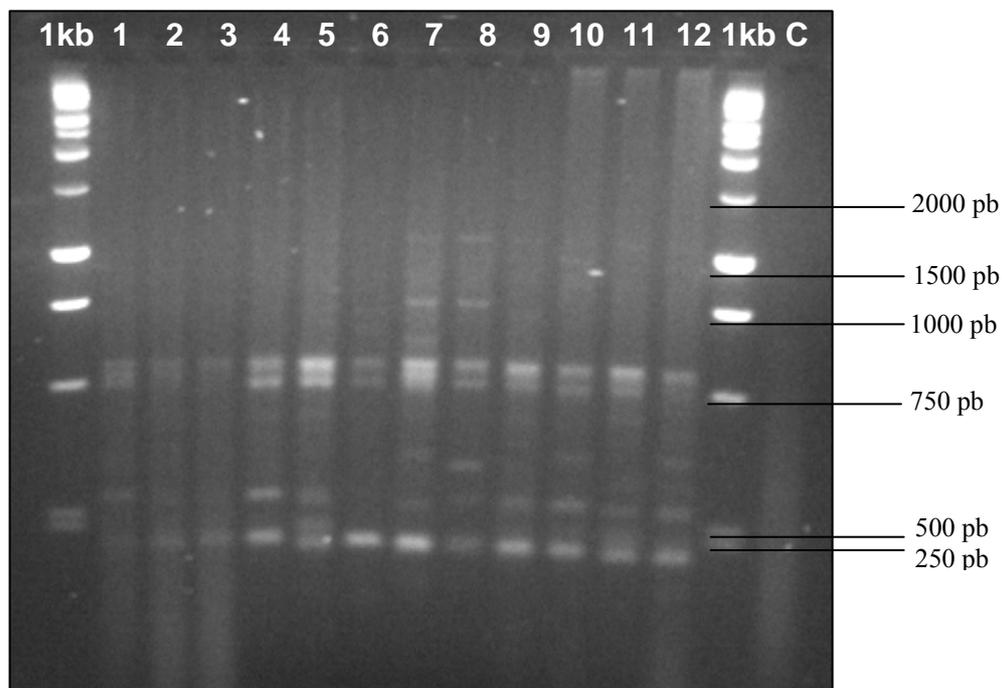


**OPA 3**

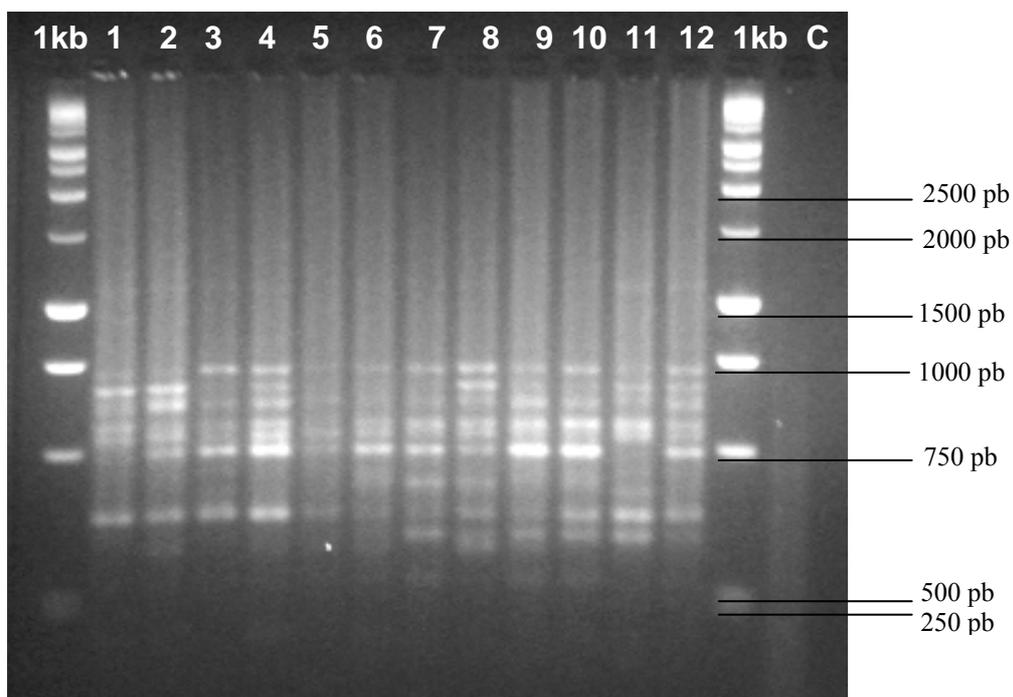


**OPA 4**

**Apêndice 3.** (Cont.) Produtos de RAPD obtidos a partir dos oligonucleotídeos OPA 7 e OPA 8, para os 12 genótipos de cana-de-açúcar considerados em estudo. 1kb-marcador 1kb Ladder, C-amostra controle, 1-RB9364, 2-RB931011, 3-RB94503, 4-RB93509, 5-RB72454, 6-RB951541, 7-SP79-1011, 8-RB931530, 9-RB92579, 10-RB931003, 11-RB961, 12-RB931611.

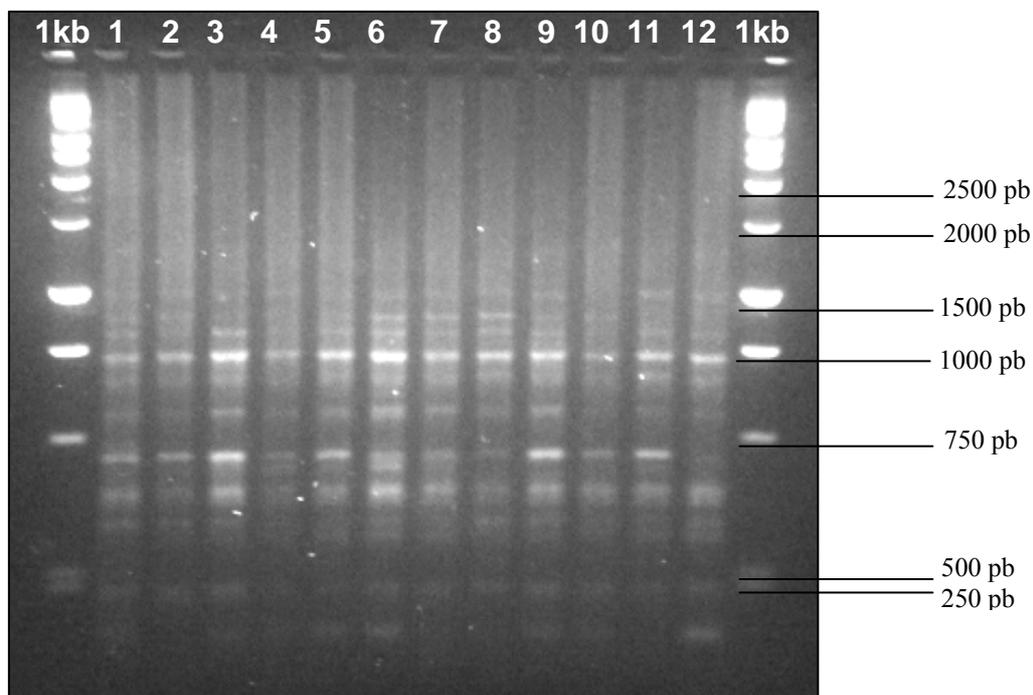


**OPA 7**

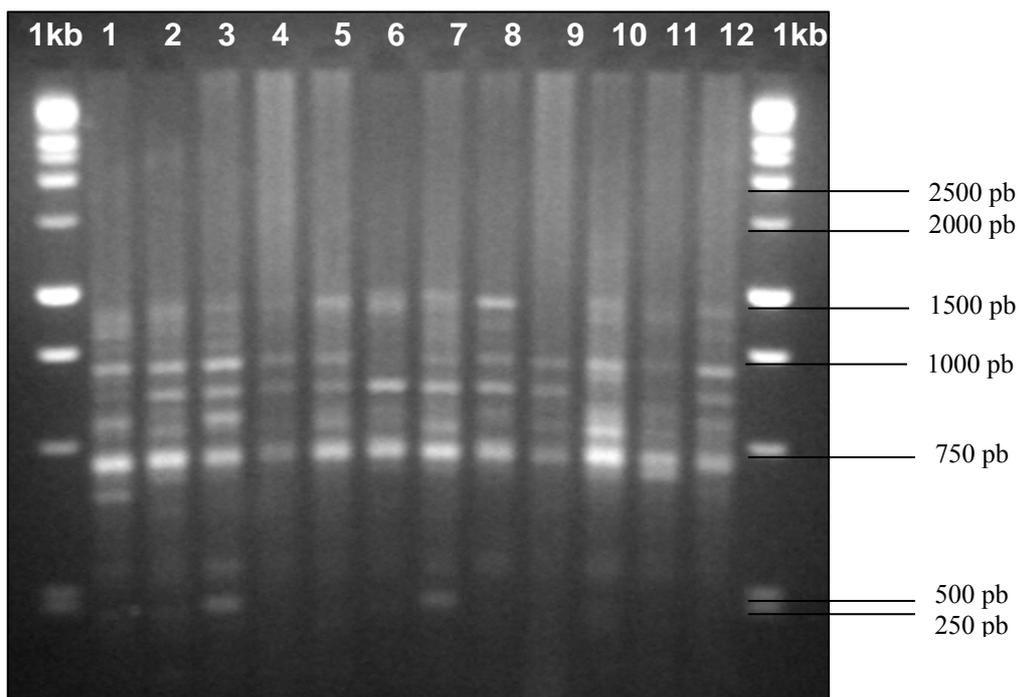


**OPA 8**

**Apêndice 3.** (Cont.) Produtos de RAPD obtidos a partir dos oligonucleotídeos OPA 10 e OPA 16, para os 12 genótipos de cana-de-açúcar considerados em estudo. 1kb-marcador 1kb Ladder, C-amostra controle, 1-RB9364, 2-RB931011, 3-RB94503, 4-RB93509, 5-RB72454, 6-RB951541, 7-SP79-1011, 8-RB931530, 9-RB92579, 10-RB931003, 11-RB961, 12-RB931611.

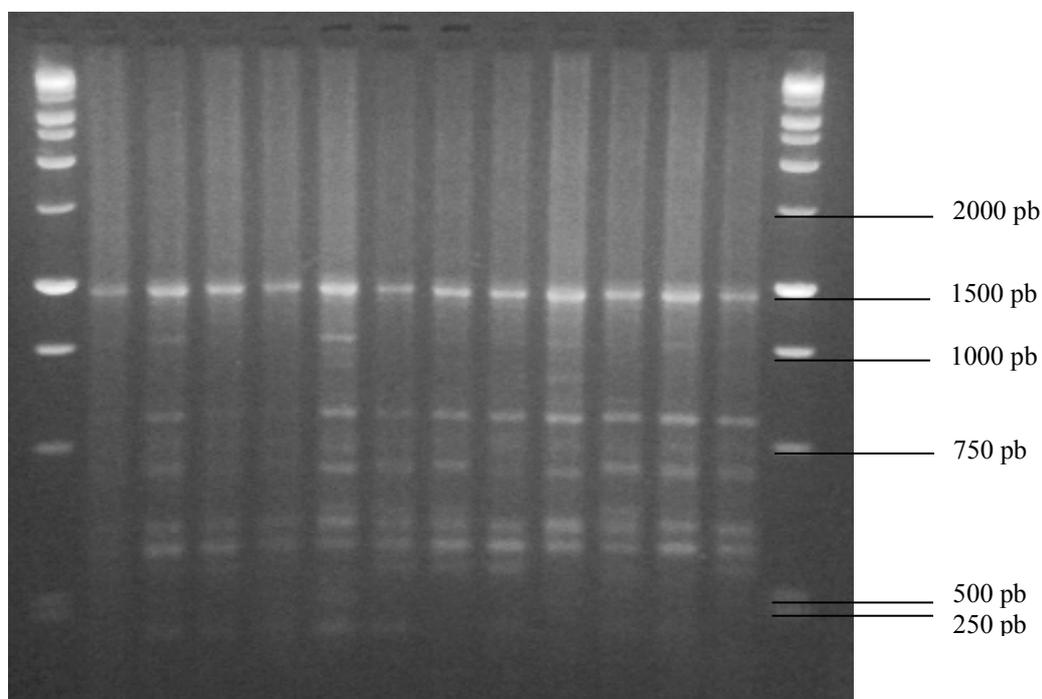


**OPA 10**

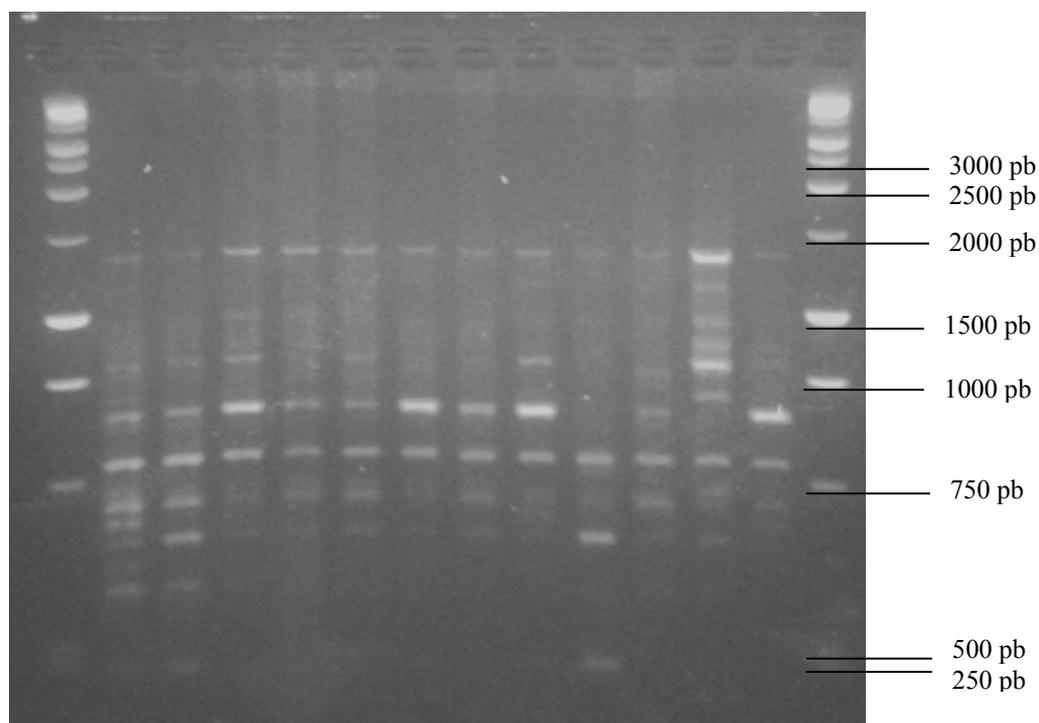


**OPA 16**

**Apêndice 3.** (Cont.) Produtos de RAPD obtidos a partir dos oligonucleotídeos OPA 18 e OPA 20, para os 12 genótipos de cana-de-açúcar considerados em estudo. 1kb-marcador 1kb Ladder, C-amostra controle, 1-RB9364, 2-RB931011, 3-RB94503, 4-RB93509, 5-RB72454, 6-RB951541, 7-SP79-1011, 8-RB931530, 9-RB92579, 10-RB931003, 11-RB961, 12-RB931611.



**OPA 18**



**OPA 20**

**Apêndice 4.** Matriz binária RAPD produzidas a partir dos 11 oligonucleotídeos OPA 1, OPA 2, OPA 3, OPA 4, OPA 7, OPA 8, OPA 9, OPA 10, OPA 16, OPA 18 e OPA 20.

PRIMERS	RB9364	RB931011	RB94503	RB93509	RB72454	RB951541	SP79-1011	RB931530	RB92579	RB931003	RB961	RB931611
OPA1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
OPA1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OPA1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
OPA1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPA1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
OPA2	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
OPA2	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1
OPA2	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0
OPA2	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0
OPA2	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0
OPA2	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1
OPA2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
OPA2	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1
OPA2	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
OPA2	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1
OPA3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1
OPA3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1
OPA3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1
OPA3	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPA4	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0
OPA4	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	0
OPA4	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
OPA4	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPA4	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
OPA4	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
OPA4	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0
OPA4	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
OPA4	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
OPA7	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
OPA7	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
OPA7	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
OPA7	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPA7	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0
OPA7	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1
OPA7	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
OPA7	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1
OPA7	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
OPA7	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPA8	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1
OPA8	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
OPA8	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1
OPA8	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
OPA8	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0

