Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

Comportamento meiótico em cana-de-açúcar (Saccharum spp.) e identificação das associações cromossômicas em meiose I por marcação dos centrômeros usando FISH

Carmelice Boff de Almeida

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em Ciências. Área de concentração: Genética e Melhoramento de Plantas

Piracicaba 2016 Carmelice Boff de Almeida Licenciada em Ciências Biológicas

Comportamento meiótico em cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) e identificação das associações cromossômicas em meiose I por marcação dos centrômeros usando FISH

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientadora: Profa. Dra. MARIA LUCIA CARNEIRO VIEIRA

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em Ciências. Área de concentração: Genética e Melhoramento de Plantas

Piracicaba 2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação DIVISÃO DE BIBLIOTECA - DIBD/ESALQ/USP

Almeida, Carmelice Boff de Comportamento meiótico em cana-de-açúcar (Saccharum spp.) e identificação das associações cromossômicas em meiose I por marcação dos centrômeros usando FISH / Carmelice Boff de Almeida. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2016. 79 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Poliploidia 2. Irregularidades meióticas 3. Pareamento cromossômico 4. Hibridização in situ fluorescente I. Título

> CDD 633.61 A447c

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte - O autor"

A todas as pessoas que me adotaram pela vida

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (ESALQ) e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, pela oportunidade de realizar o curso de doutorado, aprimorando meus conhecimentos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudo.

À professora Dra. Maria Lucia Carneiro Vieira, pela sua dedicação, ensinamentos e orientações para a realização deste trabalho e para a minha formação profissional.

Ao Centro de Cana do IAC, representado pelo Dr. Mauro Alexandre Xavier e pela Dra. Luciana Rossini Pinto, pela disponibilidade e pelo fornecimento do material vegetal utilizado neste trabalho.

À professora Dra. Maria Suely Pagliarini (*in memoriam*), da Universidade Estadual de Maringá (UEM), pela sua atenção e orientação que foram cruciais no início das etapas da análise meiótica.

À professora Dra. Eliana Regina Forni Martins e a Dra. Luana Olinda Tacuatiá, pela receptividade no Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), solicitude e colaboração na execução dos ensaios de hibridização *in situ* fluorescente.

Ao Carlos Alberto de Oliveira pelo acolhimento, carinho e auxílio na condução deste trabalho. A todos os amigos do laboratório de Genética Molecular de Plantas Cultivadas (ESALQ) pela amizade, sugestões e amparo nos momentos difíceis.

À minha família, em especial minha mãe Praxedes Boff, meu irmão João Paulo Boff Almeida e minha tia Irmã Angelina Maria Boff, por todo apoio e confiança, e por sempre estarem presentes na minha vida, a despeito da distância.

Ao Evandro Luiz Schoninger, pelo carinho e por permanecer ao meu lado a cada momento, nos dias tristes e nos repletos de alegria.

A todos os amigos, aqueles de convivência diária ou à distância, pela compreensão, incentivos e companhia.

Enfim, a todos que, embora não mencionados especificamente, contribuíram durante a minha trajetória de construção de conhecimentos e de crescimento profissional e humano, meu muito obrigado!

RESUMO	9
ABSTRACT	11
1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 Aspectos econômicos da cultura cana-de-açúcar	15
2.2 Breve histórico do cultivo da cana e origem das variedades modernas	16
2.3 Citogenética do gênero Saccharum e o genoma da cana-de-açúcar	19
2.4 Comportamento meiótico em espécies e híbridos de cana-de-açúcar	21
3 MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1 Coleta do material vegetal	27
3.2 Análise mitótica da cultivar IACSP93-3046 pelo método de Feulgen (smear) .	27
3.3 Comportamento meiótico da cultivar IACSP93-3046 analisado por	
esmagamento (<i>squash</i>)	28
3.4 Associações cromossômicas identificadas por FISH	30
3.4.1 Preparo das lâminas por gotejamento	30
3.4.2 Obtenção da sonda homóloga à região centromérica	31
3.4.3 Ensaios de FISH	37
4 RESULTADOS	39
4.1 Análise mitótica da cultivar IACSP93-3046 pelo método de Feulgen	39
4.2 Comportamento meiótico da cultivar IACSP93-3046 analisado por	
esmagamento	42
4.3 Associações cromossômicas identificadas por FISH	50
4.3.1 Obtenção da sonda homóloga à região centromérica	50
4.3.2 Ensaios de FISH	52
5 DISCUSSÃO	57
5.1 Análise mitótica da cultivar IACSP93-3046	57
5.2 Comportamento meiótico da cultivar IACSP93-3046	59
5.3 Associações cromossômicas identificadas por FISH	62
6 CONCLUSÕES	65
REFERÊNCIAS	67
ANEXOS	77

SUMÁRIO

RESUMO

Comportamento meiótico em cana-de-açúcar (Saccharum spp.) e identificação das associações cromossômicas em meiose I por marcação dos centrômeros usando FISH

A história de domesticação da cana-de-açúcar (Saccharum spp.) é atípica. As variedades modernas derivam de um processo que inclui hibridações entre a espécie domesticada S. officinarum e a silvestre S. spontaneum, sucessivos retrocruzamentos, no sentido de recuperar o genoma de S. officinarum e a seleção de progênies superiores. As genealogias contemplam cruzamentos entre genótipos e eventualmente espécies, todos com elevado grau de ploidia e número de cromossomos distintos, além de aneuploidias. Frente ao exposto, este trabalho teve como objetivos estabelecer o número de cromossomos e avaliar o comportamento meiótico da cultivar IACSP93-3046, bem como, identificar as associações cromossômicas em meiose I dos genótipos IACSP93-3046, IACSP95-3018 e de um representante de S. officinarum, Caiana Fita, pela marcação dos centrômeros usando FISH. O número de cromossomos da cultivar IACSP93-3046 foi determinado a partir de preparações do meristema radicular, tratado com 8-hidroxiquinolina (0,03%, 4h), e corado pelo método de Feulgen. As células metafásicas foram analisadas sob microscopia óptica, preferencialmente as intactas e com o mínimo de sobreposição de cromossomos. Para a análise do comportamento meiótico utilizouse a técnica de esmagamento, e as células foram coradas com carmim propiônico. Foram observadas as fases meióticas desde a metáfase I até a telófase II, bem como as tétrades. O pareamento cromossômico em meiose I foi analisado usando a técnica de hibridização in situ fluorescente (FISH). Para tanto, foram realizadas preparações dos genótipos IACSP93-3046, IACSP95-3018 e Caiana Fita por meio de gotejamento da suspensão de células em diacinese. As sondas foram obtidas por PCR, a partir da amplificação da região centromérica de cana-de-acúcar, marcadas com digoxigenina-11-dUTP, por nick translation, e detectadas com anti-digoxigeninarodamina. As lâminas foram montadas em DAPI-Vectashield e analisadas sob microscopia de fluorescência. O número diplóide 2n = 112 foi observado para a cultivar IACSP93-3046, sendo caracterizado pela primeira vez neste estudo. A IACSP93-3046 apresentou elevado microsporogênese de percentual de irregularidades (68%), as quais foram relativas à segregação dos cromossomos, incluindo migração precoce para os polos em metáfase I e II; cromossomos retardatários em anáfase e em telófase I e II; cromossomos perdidos em prófase II; e micronúcleos nas tétrades. A análise dos sítios de hibridização permitiu comprovar que os cromossomos se associam predominantemente como bivalentes em IACSP93-3046, IACSP95-3018 e Caiana Fita. As irregularidades na segregação dos cromossomos conduzem a micrósporos aneuploides, como constatado em IACSP93-3046. Desse modo, sugere-se que a assincronia do processo meiótico entre os genomas que compõem a cana-de-açúcar tem papel relevante na geração dessas irregularidades.

Palavras-chave: Poliploidia; Irregularidades meióticas; Pareamento cromossômico; Hibridização *in situ* fluorescente

ABSTRACT

Meiotic behavior in sugarcane (*Saccharum* spp.) and identification of chromosomal associations in meiosis I by labeling centromeres using FISH

The history of the sugarcane domestication (Saccharum spp.) is atypical. Modern varieties are derived from a hybridization process between the domestic species S. officinarum and the wild species S. spontaneum, successive backcrossings to recover the genome of S. officinarum, and the selection of superior progenies. The genealogies include crossings among genotypes, and possibly Saccharum species, all of them with a high degree of ploidy and different numbers of chromosomes, as well as aneuploidies. The study aimed to establish the number of chromosomes and evaluate the meiotic behavior of cultivar IACSP93-3046, and identify chromosomal associations in meiosis I of genotypes IACSP93-3046, IACSP95-3018 and Caiana Fita (a representative of S. officinarum) by labeling centromeres using fluorescence in situ hybridization (FISH). The number of chromosomes in cultivar IACSP93-3046 was determined from the root meristem preparations, treated with 8-hydroxiquinoline and stained by the Feulgen method. Metaphasic cells, preferably intact and with minimum chromosome overlap, were analyzed under an optical microscope. Meiotic behavior was examined from the preparations by using squashing method and stained with propionic carmine. Meiotic phases were observed from metaphase I to telophase II, and tetrad stages. Chromosomal pairing in meiosis I was analyzed by using the FISH technique. The slides of genotypes IACSP93-3046, IACSP95-3018 and Caiana Fita were produced by dropping a suspension of meiocytes in diakinesis. The probes were obtained through PCR, with amplification of the centromere region, and labeled with digoxigenin-11-dUTP, by nick translation, and detected with anti-digoxigeninrhodamine. The slides were mounted in DAPI-Vectashield and analyzed under a fluorescence microscope. The diploid number 2n = 112 was observed for cultivar IACSP93-3046 and characterized in this study for the first time. Microsporogenesis of IACSP93-3046 presented a high irregularity percentage regarding chromosome segregation, especially precocious migration to poles in metaphase I and II, laggard chromosomes in anaphase and telophase I and II, lost chromosomes in prophase II, and micronuclei in the tetrad stages. The analysis from the hybridization sites proved that the chromosomal pairing occurred predominantly as bivalents in IACSP93-3046, IACSP95-3018 and Caiana Fita. Chromosomal segregation irregularities led to aneuploid microspores, as confirmed in IACSP93-3046, suggesting the asynchrony in the meiotic process between the sugarcane genomes play an important role in these irregularities.

Keywords: Poliploidy; Meiotic irregularities; Chromosome pairing; Fluorescent *in situ* hybridization

1 INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) é um dos representantes da família Poaceae, pertence ao gênero *Saccharum*, o qual possui cerca de 40 espécies. A cultura destaca-se economicamente pela produção de açúcar e de etanol e, recentemente, com inovações tecnológicas tem diversificado o uso de seus subprodutos.

As canas modernas derivam de cruzamentos artificiais interespecíficos realizados no final do século XIX. Os programas de melhoramento realizaram hibridações com espécies silvestres do gênero *Saccharum*, na tentativa de obter genótipos resistentes a doenças. Nesse período, clones de *S. officinarum* (2n = 80) eram amplamente cultivados devido ao alto teor de sacarose, porém, mostravam-se suscetíveis a várias doenças. Em contrapartida, a espécie silvestre *S. spontaneum* (2n = 40 a 128) possui baixo teor de sacarose, mas é resistente a doenças e se adaptada a diversas condições ambientais (BREMER, 1961a; veja CHEAVEGATTI-GIANOTTO et al., 2011).

Os híbridos interespecíficos (*S. officinarum* x *S. spontaneum*) foram retrocruzados com *S. officinarum* a fim de recuperar características importantes da espécie. Interessantemente, durante esse processo houve a transmissão de gametas não reduzidos (2*n*) por parte de *S. officinarum* (genitor feminino) nas gerações F_1 e RC₁, resultando na constituição 2n + n (BREMER, 1961a, 1961b; PRICE, 1963a, 1963b). Em decorrência, as variedades modernas de cana apresentam 2n = 100 a 130 cromossomos, dos quais em torno de 10% correspondem a *S. spontaneum* (D'HONT et al., 1996; CUADRADO et al., 2004; PIPERIDIS; PIPERIDIS; D'HONT, 2010).

De acordo com a história de domesticação da cana-de-açúcar, é notória a complexidade genética das cultivares atuais, pois são oriundas de cruzamentos envolvendo clones e variedades com elevado grau de ploidia e número de cromossomos distintos. Assim, a constituição das cultivares compreende um conjunto de cromossomos interespecífico e aneuploide (veja HOANG et al., 2015).

Em cana-de-açúcar o comportamento meiótico é pouco elucidado e, mais importante, poucas variedades e clones foram estudados. Há certo consenso na literatura que o pareamento cromossômico ocorre preferencialmente em bivalente e que as irregularidades no decorrer da meiose são relativas à segregação irregular dos cromossomos, contribuindo para a formação de gametas aneuploides.

Frente a isso, o presente estudo teve como objetivos: *(i)* estabelecer o número de cromossomos da cultivar IACSP93-3046; *(ii)* avaliar o comportamento dos cromossomos durante a microsporogênese de IACSP93-3046; e *(iii)* identificar as associações cromossômicas em meiose I nos genótipos IACSP93-3046 e IACSP95-3018, ambas variedades brasileiras, e de um representante de *S. officinarum*, Caiana Fita, pela marcação dos centrômeros usando a técnica de hibridização *in situ* fluorescente (FISH).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Aspectos econômicos da cultura cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar é uma das culturas com maior produção em termos mundiais, sendo que, em 2014, um total de 1,9 bilhões de toneladas foi produzido (FAO, 2016). No Brasil, embora o histórico da área colhida aumentou expressivamente entre 2006 e 2014 (Figura 1, FAO, 2016), na safra de 2015/16 houve redução na área destinada ao cultivo de cana-de-açúcar, atingindo 8,6 milhões de hectares (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2016).



Figura 1 - Área colhida de cana-de-açúcar no Brasil entre os anos de 1984 e 2014. Fonte: FAO (http://faostat.fao.org/)

O país produziu 665 milhões de toneladas de cana, com destaque para o Estado de São Paulo que contribuiu com 55,2% (367 milhões de toneladas) desta produção. Nesta safra foram destinados, do total produzido, 269 e 396 milhões de toneladas para a produção de açúcar e etanol, respectivamente, atingindo 33,5 milhões de toneladas de açúcar e 30,5 bilhões de litros de etanol (CONAB, 2016). Outros produtos como biodiesel, bioeletricidade, bioplásticos, fertilizantes e etanol celulósico também são desenvolvidos a partir da cana e seus subprodutos (http://sugarcane.org/sugarcane-products). A produção de etanol celulósico a partir

do bagaço e da palha tem gerado novas perspectivas ao setor sucroalcooleiro, sem haver expansão da área cultivada e com o reaproveitamento dos subprodutos da cana. Os programas de melhoramento tem direcionado parte dos esforços para a obtenção de variedades com maior produção de biomassa visando atender essa nova demanda.

Mediante a magnitude e a importância global do setor sucroalcooleiro e com o melhor aproveitamento dos subprodutos da cana, fica evidente a estabilização da cultura e dos mercados dela derivados, principalmente pelo seu potencial de produção de energia renovável.

2.2 Breve histórico do cultivo da cana e origem das variedades modernas

A cana-de-açúcar é uma gramínea cultivada desde o século VIII para a produção de açúcar para comercialização. Atualmente, seu cultivo é realizado em mais de 100 países, em regiões tropicais e subtropicais. O gênero *Saccharum* pertence à família Poaceae, tribo Andropogoneae e cerca de 40 espécies são descritas, entre elas *Saccharum robustum*, *S. spontaneum*, *S. officinarum*, *S. barberi*, *S. edule* e *S. sinense*. O alto grau de ploidia e a ocorrência de aneuploides são característicos do gênero (CORDEIRO, et al., 2007; D'HONT et al., 1996). Os gêneros *Erianthus*, *Sclerostachya*, *Narenga* e *Miscanthus* são filogeneticamente relacionados à *Saccharum* e, por essas razões, formam o 'complexo *Saccharum*' (MUKHERJEE, 1957), constituindo um germoplasma diverso e disponível para a atuação do melhorista.

As cultivares de cana-de-açúcar atuais são genótipos superiores selecionados a partir de populações segregantes, propagados vegetativamente, de genealogia redundante, porém complexa do ponto de vista citogenético (veja CHEAVEGATTI-GIANOTTO et al., 2011). As primeiras etapas de domesticação das canas ocorreram em Nova Guiné, a partir da espécie silvestre *S. robustum* (2n = 60, 80), em que a seleção artificial atuou em direção a colmos mastigáveis, com maior teor de açúcar e baixo conteúdo de fibras, resultando em canas nobres (SIMMONDS, 1979; GRIVET et al., 2004).

Até o final do século XIX os cultivos de cana-de-açúcar eram realizados, em sua maioria, usando variedades advindas de seleção e intercruzamento de clones de *S. officinarum*. Esta espécie também é conhecida como cana nobre, em

referência ao acúmulo de sacarose, colmo espesso e ao reduzido conteúdo de fibras; porém, é susceptível a diversas doenças, tais como, o mosaico e a gomose. Hibridações artificiais interespecíficas foram realizadas devido à necessidade de obter variedades que combinassem a boa produção de açúcar e a resistência a doenças (SIMMONDS, 1979; BREMER 1961a; veja CHEAVEGATTI-GIANOTTO et al., 2011). Deste modo, há mais de um século, foram obtidos os primeiros híbridos interespecíficos derivados principalmente do cruzamento entre *S. officinarum* (2n = 80) e *S. spontaneum* (2n = 40-128).

S. spontaneum é uma espécie silvestre originária da Índia, caracterizada por apresentar ampla variabilidade morfológica, colmos finos, alto conteúdo de fibra e baixo teor de açúcar. Em contrapartida, é resistente a diversas doenças e se adapta facilmente aos ambientes, sendo encontrada numa vasta extensão geográfica (PANJE; BABU, 1960; CORDEIRO et al., 2007).

Nos relatos de G. Bremer, em 1893 obteve-se o primeiro híbrido em Java, o qual derivou do cruzamento entre a variedade Black Cheribon (2n = 80), clone de *S. officinarum* e susceptível à doença *sereh*, e Kassoer (2n = 136), um híbrido natural entre *S. officinarum* e *S. spontaneum*, considerado inicialmente como espécie silvestre. As progênies de diversos cruzamentos entre *S. officinaurm* e *S. spontaneum* foram retrocruzadas com *S. officinarum* (genitor recorrente), com o intuito de recuperar as características da cana nobre e eliminar aquelas indesejáveis do genitor silvestre (Figura 2). A este processo denominou-se nobilização e as progênies 'nobilizadas' deram origem às variedades modernas de cana, estando presentes em suas genealogias (BREMER, 1961a, 1961b).

Exemplificando, em 1921, após o segundo retrocruzamento (RC₂) com *S. officinarum*, foi obtido o clone P.O.J 2878, que mostrou desempenho superior relativamente às canas nobres; este clone compõe a genealogia de várias cultivares modernas (BREMER, 1961a, 1961b; PRICE, 1963a), inclusive as da cultivar IACSP93-3046 e do clone IACSP95-3018, estudados no presente trabalho. Estimase que 19 clones de *S. officinarum*, um de *S. barberi* e poucos clones de *S. spontaneum* constituíram o *pool* de genótipos do qual derivam as cultivares modernas (ARCENEAUX, 1967).

S. officinarum x S. spontaneum \rightarrow Clone Glagah 2n = 8x = 80 2n = 112(n+n) = 80 \downarrow (n) = 56

S. officinarum x $F_1 \rightarrow$ Clone Kassoer 2n = 8x = 80 2n = 136(n+n) = 80 \downarrow (n) = 68

S. officinarum x $\operatorname{RC}_1 \rightarrow \operatorname{ex. P.0.J} 2364$ 2n = 8x = 80 2n = 148(n) = 40 \downarrow (n) = 74

 $\frac{\text{RC}_2}{2n} \Rightarrow \text{ex. P.O.J } 2878$ $2n = \sim 114$

Figura 2 - Esquema exemplificando as hibridações interespecíficas e o processo de nobilização conduzido em cana-de-açúcar no século XIX. Fonte: adaptado de Bremer 1961a; Bremer 1961b

Interessantemente, após os cruzamentos interespecíficos, houve a transmissão de gametas não reduzidos por parte de *S. officinarum*, quando esta espécie foi usada como progenitor feminino. Este fenômeno é conhecido por restituição gamética e foi observado tanto no híbrido interespecífico (F₁) como nas progênies do RC₁, (F₁ x *S. officinarum*), resultando em gerações de constituição 2n + n tal como é mostrado na Figura 2. Esses eventos foram descritos nos clássicos trabalhos de Bremer (1961a, 1961b), em progênies (2n = 136) do cruzamento entre *S. officinarum* (2n = 80) e *S. spontaneum* (2n = 112), havendo um complemento *n* adicional ao esperado de 2n = 96. Os clones do RC₁ também conservaram o conjunto completo de *S. officinarum*, apresentando cerca de 150 cromossomos. Todavia, a transmissão de gametas não reduzidos não foi mais observada a partir do RC₂, sendo que as progênies continham *n* + *n* cromossomos. Por isso, o clone P.O.J 2878 mostra 2n = 119, que é a soma do número gamético *n* = 40 (EK 28) e *n* = 74 (P.O.J 2364), oriundos de seus genitores (SUZUKI, 1941; BREMER, 1961b).

A contagem do número de cromossomos em clones F_1 e RC₁ comprovou que a transmissão 2*n* + *n* ocorre na maioria dos cruzamentos evolvendo *S. spontaneum* (PRICE, 1957, 1961, 1963b; NAIR, 1975). Posteriormente, em 2010, usando hibridização genômica *in situ* (GISH), confirmou-se a transmissão de gametas 2*n* a

partir de *S. officinarum*, em ambas as gerações (PIPERIDIS; PIPERIDIS; D'HONT, 2010). Este fenômeno gamético explica o sucesso dos retrocruzamentos, já que a maior parte da constituição cromossômica das progênies é oriunda de *S. officinarum*, levando à rápida recuperação do alto teor de açúcar e a redução da contribuição cromossômica da espécie silvestre (SIMMONDS, 1979; PIPERIDIS; PIPERIDIS; D'HONT, 2010).

2.3 Citogenética do gênero Saccharum e o genoma da cana-de-açúcar

As espécies do gênero *Saccharum* são poliploides com nível de ploidia variando de 5× a 16×. O número básico de cromossomos do gênero (*x*) varia, tendo sido reportados x = 5, 6, 8, 10 e 12, e para algumas espécies este número foi definido através do mapeamento físico de sequências de rDNA 18S-5,8S-25S e 5S (veja as revisões D'HONT, 2005; HOANG et al., 2015).

S. robustum é uma espécie silvestre, com dois citótipos descritos sendo 2n = 60 e 80. A contagem dos sítios de rDNA revelou que *S. robustum* apresenta x = 10 e, portanto, os citótipos tem ploidia de 6× e 8×, um hexaploide e o outro octaploide, respectivamente.

S. officinarum é a única espécie do gênero com número diploide invariável (2*n* = 80), de modo que números distintos decorrem de erros de contagem ou são próprios de genótipos que derivam do intercruzamento de clones. S. officinarum é octaploide, já que o nível de ploidia é $8 \times e x = 10$ (BREMER, 1929; BRANDES; SARTORIS, 1936; D'HONT et al., 1996, 1998).

Há relatos de que o número de cromossomos de *S. spontaneum* é bastante variável, havendo citótipos com 2n = 40 a 128, sendo os mais frequentes 2n = 64, 80, 96, 112 e 128 (PANJE; BABU, 1960). O número básico é x = 8 e os clones apresentam nível de ploidia de 5× (pentaploide, 2n = 5x = 40) até 16× (hexadecaploide, 2n = 16x = 128).

S. sinense e S. barberi são híbridos naturais entre S. officinarum e S. spontaneum, possuem número cromossômico 2n = 116-120 e 2n = 81-124, respectivamente (BREMER, 1932; PRICE, 1968; D'HONT; PAULET; GLASZMANN, 2002). Já para S. edule os citótipos descritos possuem 2n = 60-80. O número básico não está completamente definido, porém os estudos sugerem x = 10 (veja HOANG et al., 2015).

A contagem do número de cromossomos para as cultivares modernas de cana não é frequente na literatura, embora haja alguns estudos que fornecem essa informação, tais como: D'Hont et al. (1996) observaram 2n = 107-105 para a cultivar R570; Cuadrado et al. (2004) determinaram o número de cromossomos para as cultivares My5514 (2n = 102-106), B42231 (2n = 110) e C236-51 (2n = 113-117); Piperidis, Piperidis e D'Hont (2010) caracterizaram sete cultivares de cana, sendo 5 da Austrália, Q117 (2n = 107-110), Q138 (2n = 115-118), Q141 (2n = 106-108), Q155 (2n = 109-110), Q165 (2n = 110) e duas da África do Sul, NCo310 (2n = 108-109) e NCo376 (2n = 112-113); Thumjamras et al. (2016) encontraram 2n = 110 para a variedade KPS01-01-25, que é cultivada na Tailândia.

O número diploide de cultivares utilizadas no Brasil foi reportado por Silvarolla e Aguiar-Perecin (1994), sendo NA56-79 (2n = 114) e Co419 (2n = 113). Ferrari (2010) caracterizou as cultivares RB72454 (2n = 112), RB835486 (2n = 112) e RB867515 (2n = 110); e recentemente, Melloni et al. (2016) descreveram o número cromossômico para IAC91-1099 (2n = 112).

O processo de nobilização aliado à restituição gamética é responsável pela menor contribuição de *S. spontaneum* na composição cromossômica das canas modernas. Por isso, em muitos artigos, a cana-de-açúcar é tratada como um autopoliploide, já que a maior parte de seu genoma é composta do complemento haploide de *S. officinarum* (*n*) em duplicata, devido a gametas não reduzidos (n + n). Assim, os clones nobilizados possuem 2n = 100-130, dos quais apenas 5 a 10% são provenientes de *S. spontaneum* (MING et al., 2006).

Em alguns programas de melhoramento, além de *S. officinarum* e *S. spontaneum*, outros *Saccharum* spp. como *S. robustum* e alguns *Erianthus* spp. (2*n* = 2x-6x = 20-60) têm sido usados para ampliar a base genética e aumentar a tolerância a estresses das cultivares modernas (TSURUTA et al., 2012; MOORE; PATERSON; TEW, 2014).

A composição cromossômica da cana-de-açúcar foi melhor compreendida com o estudo de D'Hont et al. (1996) sobre a cultivar francesa R570 (2*n* = 107-115). As variedades R são cultivadas no Caribe (Guadalupe, Martinica), na Ásia (Vietnam, Papua Nova Guiné) e em vários países da África. A cultivar R570 é a que apresenta maior adaptação a variadas condições de plantio e, por isso, vem sendo usada em estudos modernos sobre genômica (http://www.ercane.re).

Os ensaios de GISH elucidaram que 10% dos cromossomos de R570 são originários de *S. spontaneum* e 10% são decorrentes de recombinação interespecífica (D'HONT et al., 1996). Resultados similares foram obtidos para outras três cultivares (2n = 103-115), as quais apresentaram aproximadamente 80% dos cromossomos derivados de *S. officinarum*, 16% de *S. spontaneum* e menos de 5% de cromossomos recombinantes (CUADRADO et al., 2004). Piperidis, Piperidis e D'Hont (2010) também observaram de 10 a 23% de cromossomos herdados de *S. spontaneum* e de 8 a 13% de recombinantes, em sete cultivares (2n = 108-118) e três clones elite (2n = 112-119) de cana.

É importante ressaltar que esses estudos comprovaram a ocorrência de pareamento e recombinação meiótica entre os cromossomos de *S. officinarum* e *S. spontaneum*, pois admitia-se apenas a ocorrência de pareamento intraespecífico. Todavia, a presença de 10% a 11% de cromossomos de *S. spontaneum* (não recombinantes) evidencia que a recombinação interespecífica foi um evento pouco frequente na meiose dos híbridos e de suas progênies, das quais se originaram as canas modernas (D'HONT et al., 1996; PIPERIDIS; PIPERIDIS; D'HONT, 2010).

Em suma, as cultivares atuais de cana (*Saccharum* spp.) apresentam um genoma poliploide e aneuploide, constituído por um conjunto cromossômico interespecífico, porém desigual, com predomínio da espécie *S. officinarum* (veja HOANG et al., 2015).

Recentemente, uma série de informações relevantes decorrentes do sequenciamento do genoma de algumas cultivares de cana, a cerca de sequências gênicas e abundância de sequências repetitivas (OKURA et al., 2016; SETTA et al., 2014), sobre as variações alélicas (GARCIA et al., 2013; SONG et al., 2016) e o mapeamento genético (GARCIA et al., 2006; PALHARES et al., 2012; AITKEN et al., 2014) devem contribuir para explicar essa complexidade genômica.

2.4 Comportamento meiótico em espécies e híbridos de cana-de-açúcar

A meiose é caracterizada por duas divisões nucleares, resultando na formação de células filhas haploides (gametas) que sofrem fusão para dar origem ao zigoto nos organismos de reprodução sexuada. Para isso, o DNA é replicado na interfase do ciclo celular. Na prófase da primeira divisão ocorre o pareamento dos cromossomos homólogos, a permuta e a formação de quiasmas, garantindo a

regularidade da segregação cromossômica, que é dependente da precisão e do sincronismo desses eventos. Eventuais falhas no processo meiótico podem levar à variação na estrutura e no número de cromossomos das células filhas, afetando a fertilidade dos gametas (veja CAI; XU, 2007).

Salvo as espécies vegetais que evoluíram por poliploidia e se comportam como diploides, a estabilidade meiótica em organismos que possuem três ou mais conjuntos de cromossomos ($\geq 3n$), geralmente, é menor, comprometendo a formação de células com número haploide (*n*) de cromossomos. Em poliploides, auto- e alopoliploides, o pareamento cromossômico pode ocorrer tanto na configuração bivalente como multivalente (tri-, quadri-, penta- e hexavalente, por exemplo). As associações multivalentes podem levar à segregação desigual dos cromossomos e, como consequência, à formação de gametas não balanceados, com maior ou menor número relativamente ao esperado (*n* + 1, *n* – 1, entre outros).

O pareamento bivalente assegura a estabilidade meiótica em espécies poliploides. Da mesma forma, a separação adequada de multivalentes favorece a disjunção regular dos cromossomos; exemplificando, a configuração alternada de um quadrivalente resulta na segregação 2:2 na anáfase I. Todavia, em multivalentes compostos por números ímpares de cromossomos a segregação regular não acontece (veja COMAI, 2005).

A literatura a respeito desse assunto é vasta, de tal sorte que não se tem a pretensão de apresentar aqui uma revisão sobre a citogenética de poliploides naturais. Estima-se que 60% das plantas cultivadas são espécies cuja evolução se deu por poliploidia. Por exemplo, o trigo comum (*Triticum aestivum*) é um alohexaploide natural (2n = 6x = 42), cuja história evolutiva envolve três espécies diploides. Duas hibridações interespecíficas, seguidas da respectiva duplicação dos cromossomos do híbrido, explicam a sua composição (AA x BB \rightarrow ABB \rightarrow AABB x DD \rightarrow ABD \rightarrow AABBDD). Nesta espécie ocorre, exclusivamente, associação em bivalente (intragenômico) na prófase I da meiose I. Esse comportamento, semelhante ao de um diploide, é controlado geneticamente pelo gene *Ph* (*pairing homeologous 1*), que suprime o pareamento de cromossomos ditos homeólogos ou parcialmente homólogos. Quando há deleção do loco *Ph*, mutantes de trigo exibem pareamento interespecífico (RILEY; CHAPMAN, 1958; YOUSAFZAI; AL-KAFF; MOORE, 2010).

No caso do trigo e de tantos outros poliploides (auto- e alopoliploides) a natureza conduz à fertilidade por uma combinação de fatores cromossômicos e gênicos ou, alternativamente, a espécie é mantida por propagação vegetativa, como é o caso das bananas cultivadas. Espécies do gênero *Musa* evoluíram por poliploidia, a partir das espécies diploides silvestres *M. acuminata* (AA) e *M. balbisiana* (BB), dando origem aos triploides AAA, AAB e ABB, que são inférteis devido às irregularidades meióticas, já que se formam bivalentes, trivalentes e univalentes na meiose I. As cultivares comerciais são mantidas devido à propagação vegetativa, típica das bananas triploides (veja JERIDI et al., 2012).

Além disso, as irregularidades durante a meiose podem contribuir para a geração de gametas aneuploides. Estudos sobre o gênero *Brachiaria* tem mostrado a ocorrência de migração precoce de cromossomos em metáfase I e II, a disjunção tardia para os polos em anáfase I e II, ocasionando micronúcleos em tétrades, eliminação de cromossomos e à formação de aneuploides, sobretudo nos acessos tetraploides e hexaploides (MENDES-BONATO et al., 2002a, 2002b, 2006).

O gênero Saccharum tem sido pouco estudado em relação ao comportamento meiótico das espécies que o compõem. Nos vários citótipos analisados de *S. spontaneum*, o pareamento dos cromossomos na meiose I, em sua maioria, é do tipo bivalente. Há relatos de que os clones Glagah (2n = 112) e North Celebes (2n = 80) apresentam pareamento completo com 56 e 40 bivalentes, respectivamente; bem como, nas progênies (2n = 96) de Glagah x North Celebes observaram-se 48 bivalentes (BREMER, 1961b).

O predomínio de bivalentes foi demonstrado por Nair (1972b) ao avaliar clones de *S. spontaneum*, com 2n = 40-128. Univalentes, no máximo 4 por célula, foram visualizados em 50% dos clones e não se observaram multivalentes. Na maioria dos clones foram constatadas irregularidades como cromossomos retardatários, pontes, micronúcleos e gametas aneuploides, esses com variação de n - 1 a n - 5, n + 1 a n + 4 (NAIR, 1972a). O autor verificou haver correlação entre a presença de irregularidades meióticas e de gametas aneuploides. Diante disso, assume-se que a segregação desigual e a perda de cromossomos durante a meiose são responsáveis pelas aneuploidias observadas.

Sreenivasan e Jagathesan (1975) identificaram a ocorrência de uni-, tri- e quadrivalentes em 28 clones de *S. spontaneum* (2n = 40-126), porém em baixa frequência. Além disso, os microsporócitos mostravam variação do número diploide

de 2n - 2 a 2n - 14, 2n + 2 a 2n + 15. Em contrapartida, outros autores classificaram como regular a meiose de clones de *S. spontaneum* (2n = 52-112), já que univalentes e cromossomos retardatários foram visualizados ocasionalmente (SREENIVASAN; SREENIVASAN, 1984).

S. officinarum (2n = 80) é estável devido à formação restrita de bivalentes, embora existam estudos que relatam a presença de uni- e quadrivalentes (NISHIYAMA, 1956; BREMER, 1961b; PRICE, 1963a).

Em *S. robustum* são formados 30 e 40 bivalentes nos citótipos com 2n = 60 e 2n = 80, respectivamente. Entretanto, em um clone do citótipo 2n = 60, foi notificada a ocorrência de 29 bivalentes e 2 univalentes. No que se refere às irregularidades, *S. robustum* raramente apresentou cromossomos retardatários em anáfase e telófase I (SREENIVASAN; SREENIVASAN, 1984).

Percebe-se pelos relatos acima apresentados que o pareamento bivalente prevalece na meiose das espécies silvestres que compõem o gênero *Saccharum*; entretanto, certas irregularidades são notadas, refletindo possivelmente que a disrupção entre elas ainda não é completa, ou que o material vegetal estudado sofreu algum tipo de influência antrópica, isto é, seleção artificial.

Por outro lado, estudos meióticos têm demostrado que *Erianthus*, *Miscanthus* e *Narenga* possuem meiose regular, com alta frequência de bivalentes e poucos univalentes, multivalentes e micronúcleos em telófase II. Ao se comparar clones desses três gêneros com os de *S. robustum* e *S. spontaneum*, notou-se que há maior frequência de irregularidades em *Saccharum*, sendo, por isso, considerado menos estável (BURNER, 1991).

Em híbridos interespecíficos (*S. officinarum* x *S. spontaneum*) e em canas modernas o comportamento meiótico tende a ser semelhante ao das espécies silvestres, quanto à prevalência do pareamento bivalente. Nair (1975) ao estudar 164 híbridos interespecíficos entre *S. officinarum* e *S. spontaneum* (2n = 54 a 2n = 128), constatou a formação majoritária de bivalentes. Configurações multivalentes (tri- ou quadrivalentes) foram visualizadas em poucos híbridos, em contrapartida, univalentes (1 a 12 por célula) ocorreram na maioria deles. Além disso, cromossomos retardatários, pontes e micronúcleos em tétrades foram observados. Resultados similares foram obtidos por Price (1963a, 1963b) em híbridos (*S. officinarum* x *S. spontaneum*) e em quatro cultivares do Havaí, havendo de 2 a 8 univalentes por célula e escassos trivalentes em meiose I.

Trabalhos clássicos mostram que clones provenientes do processo de nobilização, da geração RC₁ (P.O.J 2364) e RC₂ (P.O.J 2725, 2722, 2878 e 2883), apresentaram, em média, 93% dos cromossomos em configuração bivalente. Cerca de 5 a 14 univalentes por célula e, para dois dos clones, em algumas células observaram-se tri- e quadrivalentes (SUZUKI, 1941). Também, em 21 clones (2n = 99-118), variedades comerciais e clones elites usados no programa de melhoramento de Louisiana, houve 90% de pareamento bivalente. A ocorrência de uni-, tri- e quadrivalentes, foi no máximo de 6,3, 1,4 e 0,8 por célula, respectivamente (BURNER; LEGENDRE, 1994).

Recentemente, a microsporogênese de nove clones (*Saccharum* spp. hybrids) foi investigada por Bielig, Mariani e Berding (2003). Os autores relataram que a maioria das associações era do tipo bivalente, com raros univalentes e ausência de multivalentes, em todos os genótipos analisados. As irregularidades mais frequentes incluíam cromossomos retardatários em telófase I, divisão assíncrona na meiose II, tríades e díades.

A análise meiótica das variedades modernas de cana cultivadas no Brasil é escassa, existindo apenas o estudo realizado por Pagliarini, Silva e Mollinari (1990) com as cultivares IAC 51-205, CB 53-98, SP 70-1078 e SP 70-1143. As irregularidades constatadas incluíram: migração precoce em metáfase I, cromossomos retardatários em anáfase I e II, micronúcleos em telófase I e II, tétrades e micrósporos. Quanto ao pareamento, os autores optaram por não identificar as associações presentes nessas cultivares, pois o tamanho pequeno dos cromossomos dificultou a distinção entre uni-, bi- e multivalentes. O elevado número, o tamanho e o aspecto dos cromossomos meióticos têm dificultado as análises em cana-de-açúcar, acarretando em erros de interpretação das configurações (PRICE, 1963a; PAGLIARINI; SILVA; MOLLINARI, 1990; BURNER, 1991).

Com base na literatura, constata-se que as aneuploidias relatadas na microsporogênese de cana-de-açúcar são decorrentes de outras irregularidades e não da formação de multivalentes, uma vez que, o pareamento bivalente é predominante nas espécies, híbridos interespecíficos e cultivares modernas.

Concluindo, as irregularidades meióticas resumem-se na presença de univalentes com migração precoce em metáfase, pontes cromossômicas, cromossomos retardatários em anáfase, divisão assíncrona e a presença micronúcleos. Essas irregularidades são visualizadas em outros poliploides, entretanto, nas canas, elas vêm sendo mantidas e toleradas devido à propagação vegetativa. Nesse aspecto, fica claro que a instabilidade cromossômica no decorrer da meiose é responsável pela produção frequente de gametas aneuploides e pela origem de progênies com número diferentes de cromossomos a partir da mesma ascendência (NAIR, 1972a).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta do material vegetal

No presente estudo foram usados a cultivar de cana-de-açúcar IACSP93-3046, o clone IACSP95-3018 e um representante da espécie *Saccharum officinarum* denominado Caiana Fita (2n = 80). IACSP93-3046 é proveniente do policruzamento SP79-1011 x ? (veja Anexo A), foi lançada em 2005, possui hábito de crescimento ereto, bom perfilhamento, e é classificada como resistente às doenças mosaico, ferrugem e como intermediária ao carvão (LANDELL et al., 2005). IACSP95-3018 é um clone elite do Programa de Melhoramento de Cana do IAC, originário do cruzamento biparental SP84-2189 x SP80-1842 (veja Anexo A). Esses genótipos possuem desempenho similar em cana planta para os caracteres altura de colmo, número de colmo, toneladas de cana por hectare, teor de sacarose e brix (MANCINI et al., 2012). No entanto, IACSP95-3018 é suscetível à ferrugem.

As panículas e os colmos foram coletados na Estação de Hibridação do Programa Cana IAC (latitude 14º 28' 27" S e longitude 39º 04' 46" O), pertencente ao Centro APTA Cana, e situada em Serra Grande, distrito do município de Uruçuca, BA. As panículas em estágio imaturo foram acondicionadas em frascos de vidro, após a retirada da folha bandeira, com solução fixadora Carnoy (etanol: ácido acético, 3:1 v/v) sob temperatura ambiente, conforme Sharma e Sharma (1980). A solução foi substituída depois de 24 horas, e as amostras foram transportadas e armazenadas a 4ºC no Laboratório de Genética Molecular de Plantas Cultivadas do Departamento de Genética da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", em Piracicaba, SP. Os colmos foram cortados em mini-toletes (com a presença de uma gema), acomodados em bandejas plásticas contendo *Sphagnum* umedecido e mantidos a 28°C em sala de crescimento para enraizamento e brotação. Após 20 dias, as mudas foram transplantadas para vasos com substrato Basaplant hortaliças BX, em casa de vegetação, no mesmo local.

3.2 Análise mitótica da cultivar IACSP93-3046 pelo método de Feulgen (smear)

O número de cromossomos foi obtido a partir de preparações do meristema radicular utilizando-se o método de Feulgen. Os mini-toletes foram colocados para

enraizamento conforme mencionado no item 3.1. Após 5 a 14 dias, raízes de 1 a 3 cm de comprimento foram coletadas e imediatamente tratadas com 8hidroxiquinolina (0,03% p/v, Sigma), por 4 horas à temperatura ambiente. As raízes foram submetidas a duas lavagens de 5 minutos cada, fixadas em solução Carnoy (etanol: ácido acético, 3:1 v/v) por 24 horas, transferidas para etanol 70% e armazenadas a 4°C.

Para promover a reação de Feulgen, uma técnica de citoquímica intermediada pelo reativo de Schiff, as raízes foram lavadas em água destilada por duas vezes (5 minutos cada), e hidrolisadas em HCl 1N a 60°C durante 8 minutos, em banhomaria, sendo novamente lavadas em água destilada e submetidas à coloração com reativo de Schiff por 45 minutos, protegidas da luz. Posteriormente, as raízes foram lavadas em água de torneira por, no mínimo, três vezes, maceradas em solução enzimática contendo 2% de celulase (Onozuka) e 20% de pectinase (Sigma), a 37°C por 60 minutos, e lavadas em água destilada por duas vezes (5 minutos cada).

No preparo das lâminas, as raízes foram imersas em solução de ácido acético 45% durante 4 minutos. Em seguida, uma raiz foi transferida para uma lâmina contendo 1 a 2 gotas do corante carmim acético 1% e o meristema (a ponta da raiz) esmagado usando um bastão de cobre, para a individualização das células. A preparação foi coberta com lamínula de vidro (22 x 22 mm), aquecida em uma chama de lamparina e pressionada firmemente entre papel filtro. As lamínulas foram removidas em solução de ácido acético 45%, secas sob temperatura ambiente, e montadas (lâminas e lamínulas) com Entellan (Merck). A análise foi realizada sob microscopia óptica e as células fotografadas com câmera digital Optikam B3 (Optika) acoplada ao microscópio BX50 (Olympus). Um total de 20 células em prometáfase ou metáfase foi selecionado para a contagem dos cromossomos, preferencialmente células intactas e sem sobreposição de cromossomos.

3.3 Comportamento meiótico da cultivar IACSP93-3046 analisado por esmagamento (*squash*)

O comportamento meiótico foi analisado a partir de preparações obtidas pela técnica de esmagamento (SHARMA; SHARMA, 1980). A espigueta foi dissecada, as anteras transferidas para uma lâmina contendo 1 a 2 gotas de solução de carmim propiônico 1%, seccionadas transversalmente e esmagadas levemente para a

expulsão dos microsporócitos. Os fragmentos de parede das anteras foram retirados com pinça e a preparação foi coberta com lamínula (24 x 32 mm), aquecida usando uma chama de lamparina e pressionada levemente entre papel filtro. A lâmina foi vedada com cola BV-02 (Vipal) e posteriormente analisada sob microscopia óptica. As três anteras da espigueta foram usadas no preparo de uma lâmina.

Todas as fases do processo meiótico foram identificadas segundo Singh (2003) e documentadas em câmera digital Optikam B3 (Optika) acoplada ao microscópio BX50 (Olympus). Foram avaliados 700 microsporócitos, especificamente meiócitos intactos e envoltos pela capa de calose. As fases analisadas do ponto de vista da segregação cromossômica incluíram desde a metáfase I da meiose I até a telófase II da meiose II, bem como as tétrades. Em cada fase, de 100 a 116 células foram contabilizadas, sendo classificadas como normais e irregulares. Com exceção das fases anáfase I e II, em que foram avaliados 39 e 11 meiócitos, respectivamente, devido à dificuldade de se encontrar espiguetas mostrando tais fases. O percentual de células com irregularidades foi estimado em relação ao total de células analisadas em cada fase.

Detalhando, na metáfase I e II, foi observado o alinhamento dos cromossomos na placa metafásica; desse modo, meiócitos com migração precoce ou cromossomos perdidos foram designados irregulares. Nas células em anáfase (I e II) verificou-se a migração dos cromossomos para os polos e, consequentemente, os cromossomos com disjunção tardia foram considerados com comportamento irregular e classificados como retardatários. Na telófase I e II, foi avaliado se os cromossomos alcançaram os polos e se os núcleos filhos foram constituídos; caso contrário, os meiócitos com cromossomos retardatários foram registrados como portadores de irregularidades. Na prófase II, foram qualificadas como irregulares as células que apresentavam cromossomos perdidos, que não foram incluídos nos núcleos e permaneceram dispersos no citoplasma. No final da meiose, foi observado se as células-mães do grão de pólen continham quatro micrósporos – estágio de tétrade – ou outras configurações como díades, tríades e políades. Nos micrósporos foi verificada a possível presença de micronúcleos.

3.4 Associações cromossômicas identificadas por FISH

Para a identificação das configurações relativas ao pareamento dos cromossomos foi realizada a marcação dos centrômeros pela técnica de hibridização *in situ* fluorescente (FISH). Esta etapa foi executada no Laboratório de Biossistemática e Polinização, pertencente ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), sob orientação da Profa. Dra. Eliana Regina Forni Martins.

Nos ensaios da FISH foram usadas preparações cromossômicas dos genótipos IACSP93-3046, IACSP95-3018, e de Caiana Fita, este como controle. Os procedimentos referentes ao preparo das lâminas, obtenção da sonda homóloga à região centromérica e a hibridização *in situ* estão descritos a seguir.

3.4.1 Preparo das lâminas por gotejamento

As anteras foram previamente selecionadas quanto à fase dos meiócitos. Apenas uma antera da espigueta foi usada na confecção das lâminas pelo método de esmagamento em solução de ácido acético 45%. Caso a maioria dos meiócitos estivesse em diacinese, as demais anteras eram transferidas para um microtubo contendo a solução fixadora (etanol: ácido acético, 3:1 v/v).

Para o preparo da suspensão celular, foram usadas 12 anteras, conforme protocolo estabelecido por Murata e Motoyoshi (1995), com modificações. As anteras selecionadas foram lavadas três vezes em água destilada, por 10 minutos cada. Em seguida, foram submersas em solução enzimática (a 37° C por 10 minutos), composta de 2% de celulase (Onozuka), 20% de pectinase (Sigma) e 1% de macerozima (Sigma). Após a digestão, as anteras foram fragmentadas com auxílio de uma micropipeta e essa suspensão foi centrifugada a 13.000 rpm por 5 minutos (centrífuga 5415 R, Eppendorf). Subsequentemente, a solução enzimática foi removida, o sedimento celular ressuspenso em 50 µl de água destilada e centrifugado nas condições mencionadas. Esta última etapa foi executada novamente usando 50 µl de solução fixadora 3:1, ao invés de água destilada. Ao término da centrifugação, o sedimento celular foi ressuspenso em 30 µl de solução fixadora 3:1, e a suspensão foi utilizada imediatamente ou armazenada a -20° C. Nove microlitros da suspensão celular foram gotejados sobre uma lâmina e, após

serem secas à temperatura ambiente, as lâminas foram analisadas sob contraste de fase quanto à presença de meiócitos em diacinese. As melhores lâminas foram selecionadas para os ensaios de FISH e armazenadas a -20°C.

Para o clone IACSP95-3018 e Caiana Fita foi necessário ajustar o protocolo de preparo da suspensão celular devido à quantidade remanescente de citoplasma nos meiócitos. Assim, o tempo de digestão foi de 13 minutos e a proporção dos compostos na solução fixadora foi de 1:1.

3.4.2 Obtenção da sonda homóloga à região centromérica

O processo de construção da sonda teve início com a extração do DNA genômico, desenho de *primers* e amplificação via PCR da região centromérica, sequenciamento dos fragmentos para verificar se correspondiam às sequências centroméricas, e por último, a marcação dos produtos da PCR por *nick translation*. Essas etapas estão detalhadas a seguir.

O DNA genômico de IACSP93-3046, IACSP95-3018 e Caiana Fita foi extraído segundo protocolo adaptado de Doyle e Doyle (1990). Folhas jovens, sem nervura central, foram maceradas em nitrogênio líquido e 2 g foram transferidos para um tubo Falcon de 15 ml, adicionando 9 ml de tampão de extração (2% CTAB p/v, 1,4 M NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl pH 8,0, 1% PVP 40.000 p/v e 1% 2-mercaptoetanol), previamente aquecido. As amostras foram misturadas e incubadas a 65°C por 30 minutos, em banho-maria. Posteriormente, 4,5 ml da solução de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1 v/v) foram acrescentados, e as amostras homogeneizadas por inversão durante 5 minutos e centrifugadas por 15 minutos. Todas as centrifugações no decorrer desse protocolo foram realizadas a 5.000 rpm, velocidade máxima obtida para o rotor de tubos Falcon (15 ml) usando a centrífuga 5804 R (Eppendorf). Em seguida, a fase superior foi transferida para um novo tubo e tratada com RNAse (concentração final de 10 µg/ml) a 37°C por 40 minutos, em banho-maria.

Após esse período, o DNA foi precipitado com 4,5 ml de isopropanol resfriado, durante 30 minutos a -20°C. As amostras foram centrifugadas por 15 minutos e o sobrenadante descartado. O *pellet* foi seco à temperatura ambiente e eluído em 5 ml de solução de lavagem (76% etanol v/v, 10 mM acetato de amônio). As amostras permaneceram por, no mínimo, 30 minutos a 4°C e foram submetidas à centrifugação durante 10 minutos. O sobrenadante foi retirado e o *pellet* foi seco à temperatura ambiente e ressuspenso em 400 µl de TE (Tris-HCl 10 mM pH 8,0, EDTA 1 mM pH 8,0).

Uma etapa adicional de purificação foi realizada com 400 µl de fenol resfriado, seguida de homogeneização por inversão e centrifugação por 10 minutos. A fase superior foi coletada, transferida para novos tubos, e foram adicionados aproximadamente 400 µl de clorofórmio resfriado. Os procedimentos relativos ao tratamento com fenol foram repetidos nessa etapa usando clorofórmio. Subsequente à centrifugação, a fase superior foi recuperada e o DNA precipitado com acetato de sódio 7,5 M (concentração final de 2,5 M) e etanol absoluto resfriado, durante 15 minutos a -20° C, sendo que o volume de etanol adicionado foi equivalente a 2,5 vezes o volume da solução. Finalizada a precipitação, as amostras foram centrifugadas por 15 minutos e o *pellet* lavado em 1 ml de álcool 70% e novamente centrifugado por 5 minutos. O *pellet* foi seco à temperatura ambiente e ressuspenso em 400 µl de TE.

A concentração do DNA foi estimada por espectrofotometria usando NanoDrop 2000 (Thermo Scientific), e a sua integridade verificada após eletroforese em gel de agarose 1,2% (p/v) corado com SYBR Safe 0,5× (Invitrogen).

Os primers foram desenhados com base na sequência de nucleotídeos do BAC SCHRBa_029_018, disponível no GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/), número de acesso KF184699 (SETTA et al., 2014). Este BAC pertence à biblioteca genômica da cultivar R570, construída por Tomkins et al. (1999). Conforme Setta et al. (2014), a sequência foi classificada como pericentromérica ou centromérica e possui similaridade ao motivo SCEN de cana-de-açúcar descrito por Nagaki, Tsujimoto e Sasakuma (1998). Esses últimos autores analisaram sequências repetitivas do centrômero de uma variedade egípcia, com motivo de 137 pb, e disponibilizaram as sequencias dos *primers* SCEN-A e SCEN-B.

Novos *primers* foram obtidos da seguinte maneira: *(i)* as sequências correspondentes aos *primers* SCEN-A (5'-CCATCGGGTGCGTCCAAAAT-3') e SCEN-B (5'- GTTTGCGCCAAACGTACCAT-3') foram localizadas no BAC SCHRBa_029_018; *(ii)* as regiões situadas entre os sítios de anelamento dos *primers* SCEN-A e SCEN-B foram escolhidas para o desenho manual de dois novos pares de *primers* (Figura 3); *(iii)* a possível formação de estruturas secundárias foi analisada no programa GeneRunner versão 4.0.9; finalmente, os *primers* foram

denominados como CENT1F, CENT1R, CENT2F e CENT2R, e empregados na amplificação via PCR da região centromérica dos genótipos de cana-de-açúcar aqui estudados.

a) TACGTTCGGTGCAAATCGTGCACCTATCTTGCGTCAAGATTAGCATTATCCCCCGAACGGACTGAATCGAGCTTCCACTTGAGCC TTCTAGAATAGTTCTATCTCCAAATAGAATGAAACGAGCATCCACTTGAGCATCGTCACCTAGGAGTACCATCGGCTACATCGA AAATGATTTCTGAGCCTATGGTACGCATGGTGCAAACC...//...CCTATCTTGGGTCAAGATTAGCACTATCTCCAAATGGA ATGAATTGAGCATTCAACTGAGCCTCGTCACCTAAGTGTACCATCGGGTGTGTCCAAAATGACTTCTAAGCCTATGGCACATTT GGCACAAACTGTGCACCTATCTAGAACCGACACTAACACTGTACTCCAAATAGACCCAAAACGAGATTCCAAATGACCCAAGTAA CCTAGTAGTTACATCGGGTGCGTCCAAAATGATTTCTGAGCCTATGGTATGTTCGGCGCGAAGCGTGCACCTATCCCATACCAC AGCCCAGACACGACCTCTCACCTCCTGTTATCCCGTAGCCGGGCATTTCTGCTACGAACCTGCCTTCTCGAGAGGGCGGACGGC GGCATGAGCGATCGAGGCGCCTTCCCCG...//...GACATAAACCGTGCACCTGTCTTGCGTTAAAGTTAGCATTATCTCCAA ATGGAATGAAACAAGCATCCACTTGAGCCTCGTCACCTAGGAGTTCCATCGGGTGCATCCAAAAAGATTTCTGAGCCTGTGGAA AGTCGGGTGCATATCATGCACCTATCTTGCGTCAAGATTAGCACTTTCTCCCAAACGGACTGAATCGAGCTTTCACTTGAGCCTC GTCACCTAGGAGTACCATCGCGGGCGTCCAAAAGGGATTATGAGCCTATGGTACGTTTGGCGCAAACGTGCAACTATCTTGCATA AATATTAGCACTATCTCCAAACGGAATGAAACGAACATCCACTTGAGCCTCATCACCTATTAGTACTATTGGGTTCGTCCAAAA TGATTTCTAAGCCTGTGG...//...CATCCACTTGAGCTTCGTCACGTAGGAGTACCATCGGGTGCGTCTAAAATGATTTCTG AGCCTATGGTACGTTCGGCGCAAAGCATGCACCTATCTTACGTCAAGATTCGCACTATCTCCAAATGGACTGAATCGAGCTTCC ACTTGAGCCTTGTCTCCTAGAAGTATCACTGGGCACGTCCAAAATGATTTCGGAGCCT<mark>ATGGTACGTTTGGCGCAAAC</mark>CATGCA ${\tt CCTATCTTGCACCTAGGAGTTCCATCGGGTGCATCCAAAATGATTTCTGAGCCTACAGTATATTCGGCACAAATCGTGCACCTG$ TCTTGCGTCA b)

Figura 3 - Sequência do BAC SCHRBa_029_018 utilizada para o desenho de primers. Os nucleotídeos destacados em amarelo se referem às sequências dos primers SCEN-A e SCEN-B definidas por Nagaki, Tsujimoto e Sasakuma (1998); em azul estão as sequências dos primers CENT1F e CENT1R (a); e em preto as dos primers CENT2F e CENT2R (b). A sequência correspondente ao primer CENT2R contém nucleotídeos em comum com a do primer SCEN-B, os quais estão sublinhados. As barras (...//...) representam os nucleotídeos que foram omitidos para a construção da imagem No preparo das reações de amplificação foram usados: 1× de solução tampão, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 0,3 µM de cada *primer*, 1 U de GoTaq Flexi DNA Polymerase (Promega), 40 ng de DNA genômico e água ultrapura para volume final de 20 µl. As amplificações foram realizadas em termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) com uma etapa de desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos de 95°C por 40 segundos, 60°C por 50 segundos, 72°C por 1 minuto e 30 segundos, e uma extensão final a 72°C por 10 minutos. Os produtos da PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,2% (p/v) corado com SYBR Safe 0,5× (Invitrogen).

Com o intuito de confirmar se os amplicons correspondiam à região centromérica, os produtos da PCR obtidos com os primers CENT2F e CENT2R foram clonados e sequenciados. Para tal, cerca de 100 µl do produto da PCR de cada genótipo foram purificados com o kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega). Os produtos purificados foram ligados ao vetor de clonagem pGEM-T Easy (Promega), após a seguinte reação: 1x de solução tampão, 50 ng do vetor, 3 U de T4 DNA Ligase, 200 ng de inserto e água ultrapura para completar o volume final de 10 µl. As reações foram mantidas a 4°C overnight. Ao término, 1,5 µl do produto da ligação foram usados para a transformação de 40 µl de células eletrocompetentes E. coli DH5a por pulso elétrico, em eletroporador Gene Pulser II (Bio-Rad). Imediatamente após a eletroporação, foi adicionado 1 ml de meio SOC (2% de triptona p/v, 0,5% de extrato de levedura p/v, 8,56 mM de NaCl, 2,5 mM de KCl, 10 mM de MgCl₂ e 20 mM de glicose, pH 7,0), e as células incubadas a 37°C por 1 hora sob agitação (200 rpm, shaker TE-421, Tecnal). Em seguida, 60 µl de suspensão bacteriana foram plaqueados com 60 µl de X-Gal (2%) e 60 µl de IPTG (20%) em meio LB sólido (1% de triptona p/v, 0,5% de extrato de levedura p/v, 0,17 M de NaCl e 1,5% de ágar p/v, pH 7,5) contendo ampicilina (50 µg/ml). As placas de Petri foram incubadas a 37°C por 16 horas.

As colônias de coloração branca foram coletadas com palito estéril e cultivadas individualmente em 6 ml de meio LB líquido (1% de triptona p/v, 0,5% de extrato de levedura p/v e 0,17 M de NaCl, pH 7,5) contendo ampicilina (50 µg/ml), a 37°C por 22 horas, sob agitação a 200 rpm. Da suspensão bacteriana total, 300 µl foram preservados em glicerol 60% a -80°C, 1 ml foi usado para confirmar a presença e identificar o tamanho do inserto via PCR, e o restante foi empregado na extração dos plasmídeos para posterior sequenciamento do inserto.

Anterior a PCR, a suspensão bacteriana (1 ml) foi centrifugada a 12.000 rpm por 3 minutos, o meio descartado e o sedimento eluído em 300 µl de água ultrapura, e novamente centrifugado nas condições mencionadas. O sobrenadante foi eliminado e o sedimento bacteriano ressuspenso em 30 µl de TE. Esta solução de células transformadas foi utilizada como DNA *template* na reação de amplificação, a qual consistiu de 1× de solução tampão, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 0,5 µM de cada *primer* M13 *forward* (5'GTTTTCCCAGTCACGAC3') e *reverse* (5'CAGGAAACAGCTATGAC3'), 1 U de GoTaq Flexi DNA Polymerase (Promega), 3 µl de DNA *template* e água ultrapura para volume final de 25 µl. Este par de *primers* permite a amplificação de um fragmento de 252 pb do vetor, além do inserto. Nas amplificações houve uma etapa de desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, seguida de 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 60°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto e 30 segundos, e uma extensão final a 72°C por 10 minutos. Os amplicons foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,2% (p/v) corado com SYBR Safe 0,5× (Invitrogen).

Os clones contendo insertos de diferentes tamanhos foram selecionados para a extração dos plasmídeos, miniprep por lise alcalina, conforme Sambrook e Russel (2001). O sequenciamento de cada inserto foi realizado usando o kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems), em ambas direções, com primers M13 forward (5'GTTTTCCCAGTCACGAC3') е os reverse (5'CAGGAAACAGCTATGAC3'). As reações constaram de 1 µl de solução tampão 5x, 1,2 µl de BigDye, 0,5 µM de primer, 500 ng do produto da miniprep e água ultrapura para volume final de 10 µl. O programa de amplificação consistiu de 1 minuto a 96°C e de 35 ciclos por 15 segundos a 96°C, 15 segundos a 50°C e 4 minutos a 60°C.

Os produtos da PCR foram precipitados com 2 µl da solução acetato de sódio (1,5 M), EDTA (250 mM) e 55 µl de etanol absoluto resfriado, mantidos sob temperatura ambiente durante 15 minutos, protegidos da luz, e centrifugados a 3.700 rpm por 60 minutos a 4°C (centrífuga 5804 R com rotor de placa, Eppendorf). A placa foi invertida e centrifugada rapidamente (spin) a 1.000 rpm para o descarte completo do sobrenadante. O precipitado foi lavado em 120 µl de etanol 70% resfriado e centrifugado a 3.700 rpm durante 30 minutos a 4°C. Após o descarte do sobrenadante, as amostras secaram por 45 minutos no fluxo laminar, ao abrigo da luz, e foram enviadas para o Laboratório de Genômica e Biologia Molecular de
Plantas, Departamento de Ciências Biológicas da ESALQ, onde se procedeu a eletroforese capilar no sequenciador ABI PRISM 3100.

As sequências foram analisadas no programa CodonCode Aligner versão 5.1.4, quanto à qualidade das bases por meio da função *Base Call*, em que se atribui um índice de qualidade denominado *Phred score*. Em seguida, bases iniciais e finais com baixo índice de qualidade foram removidas pela função *Clip Ends*, de modo que somente as sequências contendo no mínimo 100 bases com *Phred* > 20 foram mantidas. Finalmente, a sequência correspondente ao vetor de clonagem foi excluída com a função *Trim Vector*, e a montagem dos contigs (formação de apenas uma sequência para cada inserto) realizada pela função *Assemble*. Unidades repetitivas foram identificadas nos contigs por meio do programa Tandem Repeat Finder versão 4.09 e posteriormente confirmadas por alinhamento usando a ferramenta BLASTn disponível no NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov), tendo como referência o motivo centromérico SCEN (NAGAKI; TSUJIMOTO; SASAKUMA, 1998). As unidades repetitivas foram alinhadas pelo programa Codon Code Aligner com a finalidade de obter uma sequência consenso.

As sondas usadas nos ensaios de FISH foram marcadas por *nick translation*, usando o kit DIG-Nick Translation Mix (Roche). A reação consistiu de 1 µg do produto purificado da PCR, 4 µl do mix de marcação e água ultrapura para completar o volume final de 20 µl. O mix de marcação, segundo informações do fabricante, é composto de 5× de solução tampão, 50% glicerol, DNA Polimerase I, DNase I, 0,25 mM de dNTPs e 0,08 mM de digoxigenina-11-dUTP.

As reações foram homogeneizadas, centrifugadas brevemente (spin) e incubadas a 15°C por 90 minutos em termociclador Mastercycler 5333 (Eppendorf). Para precipitar a sonda marcada, foram adicionados 2 µl de acetato de sódio 3M pH 5,2 e 40 µl de etanol absoluto resfriado, e as reações mantidas a -20°C *overnight*. Posteriormente, foram centrifugadas a 12.000 rpm por 10 minutos (centrífuga 5415 R, Eppendorf), o sobrenadante descartado e o precipitado seco à temperatura ambiente. As sondas foram eluídas em 30 µl de água ultrapura e armazenadas a -20°C.

3.4.3 Ensaios de FISH

A hibridização *in situ* fluorescente foi realizada segundo Schwarzacher e Heslop-Harrison (2000), com modificações. As lâminas foram descongeladas à temperatura ambiente e, quando completamente secas, desidratadas em etanol 70% e 100% por 5 minutos em cada solução. Após 1 hora, foram tratadas com 50 µl de RNAse (100 µg/ml em 2× SSC) e incubadas a 37°C por 1 hora em câmara úmida. Posteriormente, as lâminas foram lavadas duas vezes em 2× SSC, imersas em paraformaldeído 4% (p/v) por 10 minutos, e novamente lavadas em 2× SSC duas vezes, desidratadas na mesma série alcoólica e deixadas para secar por 1 hora à temperatura ambiente. As lavagens em 2× SSC foram realizadas sob agitação (120 rpm) e durante 5 minutos cada.

A mistura de hibridização foi constituída de 50% formamida, 10% dextran sulfato, 2× SSC, 0,13% SDS, 3 ng/µl da sonda centromérica correspondente ao genótipo vegetal, e água ultrapura para o volume final de 15 µl. Em seguida, foi homogeneizada, centrifugada brevemente (spin), desnaturada a 75°C por 10 minutos, e imediatamente imersa em gelo por 5 minutos. As lâminas, contendo a mistura de hibridização, foram submetidas à desnaturação e renaturação em termociclador Mastercycler 5333 (Eppendorf) nas seguintes temperaturas: 90°C, 48°C e 38°C por 10 minutos cada, e então, incubadas a 37°C por 20 horas em câmara úmida.

Ao final da hibridização, as lâminas foram submersas em solução de 2× SSC à temperatura ambiente, com agitação (120 rpm), até as lamínulas caírem. As demais lavagens também ocorreram sob agitação e com duração de 5 minutos, sendo: duas vezes em 2× SSC, duas vezes em 0,1× SSC, uma vez em 2× SSC, uma vez em 4× SSC 0,2% Tween 20, todas a 42°C, e finalmente, uma vez em 4× SSC 0,2% Tween 20 à temperatura ambiente.

Para a detecção da hibridização, as lâminas foram tratadas com BSA 5% em câmara úmida à temperatura ambiente por 10 minutos. Posteriormente, foram incubadas com o anticorpo anti-digoxigenina-Rodanima (Roche) em BSA 5% a 37°C por 1 hora, em câmara úmida. Em seguida, foram lavadas em 4× SSC 0,2% Tween 20, por três vezes, de 5 minutos cada, sob agitação. As lâminas foram montadas em DAPI-Vectashield (Vector) e as imagens dos meiócitos em diacinese foram

capturadas em câmera digital DP72 (Olympus) acoplada ao microscópio de fluorescência BX51 (Olympus).

4 RESULTADOS

4.1 Análise mitótica da cultivar IACSP93-3046 pelo método de Feulgen

O tratamento das pontas de raiz com 0,03% de 8-hidroxiquinolina durante 4 horas resultou no acúmulo de células em metáfase e de prometáfases. Exemplificando, de um total de 10 células de uma lâmina, tomadas randomicamente, 7 células apresentaram-se em metáfase e 3 em prometáfase.

A partir da contagem dos cromossomos metafásicos obtiveram-se os números 2n = 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115 e 116, dentre os quais 108, 110 (15%, 3/20) e 112 (25%, 5/20) foram os mais frequentes (Figura 4). Um número modal não pode ser estabelecido, contudo, examinando os resultados das configurações em diacinese (apresentados no item 4.3), sugere-se <math>2n = 112 como sendo o número de cromossomos para IACSP93-3046.

Embora seja difícil descrever a morfologia dos cromossomos metafásicos de cana-de-açúcar, devido ao grande número, nota-se que o tamanho varia, em média, de 1,6 a 3,2 µm. A maioria dos cromossomos é do tipo metacêntrico ou submetacêntrico, levando-se em conta a relação de braços (comprimento do braço longo/comprimento do braço curto) que nestes tipos pode variar de 1,0 a 1,49 e de 1,50 a 2,99, respectivamente (GUERRA, 1986). Pelo menos um par de cromossomos com satélites foram observados em 4 células metafásicas do total de 20 examinadas (Figura 5 e Figura 6).



Figura 4 - Distribuição do número de cromossomos observado em 20 células metafásicas da cultivar IACSP93-3046 tratadas com 0,03% de 8hidroxiquinolina



Figura 5 - Metáfase da cultivar IACSP93-3046 com 2n = 110 (a) e prometáfase com 2n = 111 cromossomos. As setas indicam os cromossomos com satélites. Barra = 10 µm



Figura 6 - Metáfases da cultivar IACSP93-3046 com 2n = 112 cromossomos (a, b). A seta indica o cromossomo com satélite. Barra = 10 µm

4.2 Comportamento meiótico da cultivar IACSP93-3046 analisado por esmagamento

A microsporogênese da cultivar IACSP93-3046 foi avaliada a partir da análise de 700 microsporócitos (Tabela 1), dos quais 32% (223/700) apresentaram-se regulares em cada fase analisada da meiose I e II (Figura 7). Os demais 68% (477/700) mostraram irregularidades relacionadas ao comportamento dos cromossomos.

Fase	№ de células analisadas	Irregularidades	Nº de células com irregularidades ⁽¹⁾
Metáfase I	104	Migração precoce	22 (21,2)
Anáfase I	39	Cromossomos retardatários	28 (71,8)
		Pontes cromossômicas	7 (17,9)
Telófase I	102	Cromossomos retardatários	83 (81,4)
		Pontes cromossômicas	5 (4,9)
Prófase II	114	Cromossomos perdidos	99 (86,8)
Metáfase II	100	Migração precoce	57 (57,0)
		Cromossomos perdidos	21 (21,0)
Anáfase II	11	Cromossomos retardatários	8 (72,7)
Telófase II	105	Cromossomos retardatários	75 (71,4)
Metáfase/Telófase II	9	Divisão assíncrona	9 (100)
Tétrade	116	Micronúcleos	63 (54,3)
Total	700		477 (68,1)

Tabela 1 - Frequência de irregularidades observadas em microsporócitos da cultivar IACSP93-3046

⁽¹⁾ O percentual de meiócitos com irregularidades, em cada fase, é apresentado entre parênteses.

Detalhando, na meiose I, dos 245 meiócitos analisados, 41% (100/245) apresentaram-se regulares e em 59% deles (145/245) foram reconhecidas irregularidades.

O comportamento dos meiócitos que apresentaram os cromossomos distribuídos na placa metafásica, seguindo-se a movimentação para os polos e a formação dos núcleos filhos, sem a ocorrência de cromossomos retardatários,

culminando com a citocinese perpendicular ao fuso bipolar foi considerado regular (Figura 7 e-g).

Convém ressaltar que, embora tenham sido identificadas todas as fases da prófase I (leptóteno/zigóteno, paquíteno, diplóteno e diacinese), não foi possível estudá-las devido a sua complexidade, que é de difícil resolução, e ao elevado número de cromossomos. A diacinese mostrou-se a fase mais apropriada para a visualização das configurações cromossômicas (Figura 7 d), porém, não foi possível a obtenção de um número suficiente de células em diacinese (30, por exemplo), sem sobreposição dos cromossomos, para a identificação e a contagem precisa dos uni-, bi- ou multivalentes.

Analisando células em metáfase I, observou-se que em 79% (82/104) dos meiócitos, todos os cromossomos encontravam-se alinhados na placa equatorial e em apenas 21% (22/104) deles houve a ocorrência de migração precoce para os polos. Neste caso, foram observados de 1 a 2 cromossomos por célula, sendo que em 15% (16/104) dos meiócitos apenas um cromossomo migrou precocemente (Figura 8 a).

A partir da anáfase I, o percentual de microsporócitos com irregularidades aumentou de maneira expressiva, pois em 90% (35/39) das células observaram-se cromossomos retardatários ou pontes (Figura 8 b-e), e em apenas 10% (4/39) a disjunção dos cromossomos ocorreu sem atraso. Isso, possivelmente, não se deve ao número desbalanceado de células analisadas (104 células em metáfase I e 39 em anáfase I), uma vez que, as fases subsequentes também apresentaram elevado percentual de irregularidades. Na maioria dos meiócitos em telófase I (81%, 83/102) notou-se cromossomos retardatários, comprovando que as células em anáfase I realmente apresentam cromossomos com disjunção tardia.

O atraso de 1 a 5 cromossomos foi a irregularidade mais frequente em anáfase I, sendo observada em 72% (28/39) dos meiócitos. Esta é a fase em que os bivalentes ou multivalentes se separam e os membros de cada configuração iniciam o deslocamento para os polos. Houve de 1 a 3 retardatários em 62% (24/39) dos meiócitos, e em 54% (21/39) deles os retardatários encontravam-se posicionados na placa metafásica. Nota-se que os cromossomos retardatários são bivalentes, e não univalentes deslocando-se tardiamente para os polos (Figura 8 b-d).

Analisando células em telófase I, observou-se que em 86% (88/102) dos meiócitos houve cromossomos retardatários e pontes. Em apenas 14% (14/102) das

células, todos os cromossomos atingiram os polos e constituíram os núcleos filhos. Foram observados em telófase I de 1 a 10 retardatários por célula, sendo que 1, 2 e 4 foram vistos com maior frequência, em 11% (11/102), 23% (24/102) e 17% (17/102) das células, respectivamente (Figura 8 f-h). Importante dizer que, possivelmente, esses retardatários são univalentes advindos da segregação tardia de bivalentes observada na anáfase I.

Na meiose II, foram analisados 455 meiócitos, dos quais 27% (123/455) mostraram comportamento regular e 73% (332/455) irregular.

Na prófase II, em 87% (99/114) das células, houve de 1 a 10 cromossomos não incluídos nos núcleos, considerados como perdidos, normalmente situados próximos à região onde se deu a divisão citoplasmática (Figura 9 a-d). O número de cromossomos perdidos variando de 1 a 4 ocorreu em 71% (81/114) dos meiócitos, sendo os demais números menos frequentes. Esses cromossomos são decorrentes do atraso de 1 a 5 bivalentes em anáfase I, por conseguinte, não alcançaram os núcleos a tempo de serem inclusos durante a telófase I, permanecendo dispersos no citoplasma na prófase II.

Examinando células em metáfase II, 22% (22/100) delas mostraram comportamento regular e 78% (78/100) irregular. Em 57% (57/100) dos meiócitos houve cromossomos com migração precoce, sendo mais frequente a migração de 1 a 2 cromossomos (43%, 43/100), embora outros números como 3, 4 e 6 também tenham sido observados. Em 21% (21/100) das células houve de 1 a 2 cromossomos perdidos, distantes do fuso e não alinhados na placa metafásica (Figura 9 f). Cabe ressaltar que esses cromossomos perdidos também estiveram presentes em 45 células que apresentaram cromossomos migrando precocemente (Figura 9 e).

Na anáfase II, foram observados cromossomos retardatários em 73% (8/11) das células (Figura 9 g, h). No entanto, para estabelecer um percentual de irregularidade mais preciso, teria sido ideal analisar um maior número de meiócitos em anáfase II. Possivelmente trata-se de uma fase de curta duração, pois o número de células encontradas por espigueta foi reduzido.

Na telófase II, 29% (30/105) dos meiócitos mostraram comportamento regular, com cromossomos integrados nos quatro núcleos filhos. Em 71% (75/105) foram visualizados de 1 a 7 cromossomos retardatários, dos quais 1, 2 e 4 foram mais

frequentes e responsáveis por 53% (56/105) das células com irregularidades (Figura 10 a-c).

Além disso, foram observados meiócitos com divisão assíncrona, mostrando uma díade contendo uma célula em metáfase e outra em telófase (Figura 10 d), sendo que a frequência desta irregularidade foi de 3% (9/339), considerando todas as fases da meiose II. Descontando as células em prófase II, esta frequência passa a ser 4% (9/225).

Ao final da divisão, somente foram visualizadas células-mães com quatro micrósporos de tamanho similar, das quais 46% (53/116) foram classificadas como regulares e 54% (63/116) como irregulares (Figura 10 e-h). A presença de micronúcleos variou de 1 a 6 por tétrade, sendo as maiores ocorrências registradas com 1 (24%, 28/116) e 2 micronúcleos (15%, 18/116).

Em suma, a microsporogênese de IACSP93-3046 é caracterizada pela ocorrência de irregularidades relativas à segregação dos cromossomos. A partir da anáfase I, em decorrência do atraso de bivalentes, são visualizados cromossomos retardatários e perdidos nas fases subsequentes. É notória a consistência em relação às irregularidades desde a anáfase I, pois o número de bivalentes (1 a 5) com disjunção tardia corresponde com o de univalentes (1 a 10) em telófase I que ainda estão migrando para os polos. Esses cromossomos retardatários permaneceram dispersos no citoplasma, sendo observado em prófase II de 1 a 10 cromossomos foi semelhante ao da meiose I. Deste modo, os micronúcleos presentes nas tétrades são provenientes de irregularidades que ocorreram desde o início da meiose I.







С



Figura 7 - Comportamento meiótico observado em microsporócitos da cultivar IACSP93-3046. Zigóteno (a); Paquíteno (b); Diplóteno (c); Diacinese (d); Metáfase I (e); Anáfase I (f); Telófase I (g); Prófase II (h); Metáfase II (i); Anáfase II (j); Telófase II (l); Tétrade (m). Barra = 10 μm



Figura 8 - Comportamento irregular observado em microsporócitos da cultivar IACSP93-3046 durante a meiose I. Migração precoce de um univalente em metáfase I (a); Bivalentes retardatários (b-d) e ponte cromossômica em anáfase I (e); Univalentes retardatários em telófase I (f-h). Barra = 10 μm



Figura 9 - Comportamento irregular observado em microsporócitos da cultivar IACSP93-3046 durante a meiose II. Cromossomos perdidos em prófase II (a-d); Cromossomos perdidos e migração precoce em metáfase II (e, f); Cromossomos retardatários em anáfase II (g, h). Barra = 10 μm



Figura 10 - Comportamento irregular observado em microsporócitos da cultivar IACSP93-3046 durante a meiose II. Cromossomos retardatários em telófase II (a-c); Divisão assíncrona (d); Micronúcleos em tétrades (e-h). Barra = 10 µm

4.3 Associações cromossômicas identificadas por FISH

4.3.1 Obtenção da sonda homóloga à região centromérica

As amostras de DNA genômico extraídas de Caiana Fita, IACSP93-3046 e IACPS93-3018 foram consideradas íntegras e de boa qualidade (Figura 11 a). Os fragmentos resultantes da amplificação com os *primers* CENT1F e CENT1R, CENT2F e CENT2R apresentaram um perfil eletroforético de múltiplas bandas em todos os genótipos, característico de regiões repetitivas (Tabela 2 e Figura 11 b, c). Os fragmentos mais evidentes apresentaram tamanho de aproximadamente 180, 310, 450, 560, 700 e 800 bp, sendo a média da diferença entre eles de 124 pb.

A clonagem do produto da PCR resultou na coleta de 49 colônias transformadas (coloração branca), dentre as quais 18 clones foram selecionados para o sequenciamento. Na Figura 12, são apresentados os tamanhos de alguns insertos de clones de Caiana Fita e IACSP93-3046, a partir dos quais foram selecionados quatro clones, priorizando diferentes tamanhos dentro dos genótipos estudados.

Nome do <i>primer</i>	Sequência (5'-3')
CENT1F	CATCGGGTGCGTCCAAAATG
CENT1R	CGTACCATAGGCTCATAATCC
CENT2F	GGGTGCGTCCAAAATTATTTC
CENT2R	GTACCATAGGCTCAACAATC

Tabela 2 - Sequências dos pares de *primers* desenhados a partir do BAC SCHRBa_029_018, acesso KF184699



Figura 11 - Eletroforese em gel de agarose das amostras de DNA de Caiana Fita, IACSP93-3046 e IACSP95-3018, canaletas 1, 2 e 3 respectivamente. Lambda (λ) de 100 ng (a). Fragmentos da amplificação via PCR com os *primers* CENT1F, CENT1R (b) e CENT2F, CENT2R (c). Canaletas 1, 2 e 3 correspondem às amostras de Caiana Fita, IACSP93-3046 e IACSP95-3018. M - marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen). C - amostra sem DNA *template*



Figura 12 - Eletroforese em gel de agarose mostrando alguns produtos da PCR de células transformadas, utilizando o conjunto de primers M13 forward e reverse. Canaletas 1 a 5 correspondem aos clones de Caiana Fita e 6 a 10 de IACSP93-3046. O asterisco indica os clones selecionados para sequenciamento, com tamanho de aproximadamente 1100, 500, 360 e 600 pb, respectivamente. M - marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen). C - amostra sem DNA template

Com o sequenciamento dos 18 clones, foram obtidas 36 sequências, sendo que 30 delas mostraram valores de *Phred* > 20, e formaram 15 contigs com tamanho variando de 147 pb a 1201 pb. Nesses contigs, foram identificadas 27 unidades repetitivas com tamanho de 110 a 137 pb. Em um mesmo contig foi possível localizar até quatro repetições das unidades, no entanto, seis contigs apresentaram apenas uma repetição, devido ao tamanho de suas sequências.

A partir do alinhamento das 27 unidades foi obtido uma sequência consenso de 137 pb, a qual apresentou 93% de identidade com o motivo centromérico SCEN de cana-de-açúcar (Figura 13).



Figura 13 - Representação esquemática das unidades repetitivas identificadas no contig com 1201 pb, relativo ao clone Caiana Fita (a). Alinhamento da sequência consenso com o motivo centromérico SCEN de cana-deaçúcar (b)

4.3.2 Ensaios de FISH

Na hibridação *in situ* foram obtidos sinais intensos na maioria dos cromossomos, o que possibilitou identificar de forma precisa as configurações cromossômicas. Todavia, algumas associações não estavam completamente individualizadas nas diacineses do genótipo IACSP95-3018, dificultando a análise naquelas regiões.

A análise dos sítios de hibridização permitiu comprovar que os cromossomos se associam predominantemente como bivalentes, visto que, em média 95% apresentaram esse comportamento em todas as diacineses avaliadas (Tabela 3).

Célula	Associações cromossômicas*				
	Caiana Fita	IACSP93-3046	IACSP95-3018		
1	39 + 2	57 II + 1 I	51 + 2		
2	40 II	56 II	54 II + 1 I		
3	40 II	55 + 2	51 + 2		
4	40 II	56 II	51 + 2		
5	40 II	56 II + 2 I	52 + 2 + 1 V		

Tabela 3 - Associações cromossômicas observadas em diacinese de Caiana Fita, IACSP93-3046 e IACSP95-3018

* I, univalente; II, bivalente; IV, quadrivalente.

Para Caiana Fita, clone da espécie autopoliploide Saccharum officinarum, verificou-se que havia 80 cromossomos em todas as células. A formação de 40 bivalentes foi predominante (Figura 14 c), com exceção de um meiócito em que dois univalentes foram observados, possivelmente devido à terminalização precoce dos quiasmas.

Também foi constatada a prevalência de bivalentes na cultivar IACSP93-3046, com 55, 56 ou 57 II por célula. Todos os cromossomos se associaram como bivalentes em duas diacineses (Figura 15 f), no entanto, nas demais foram visualizados de 1 a 2 univalentes por célula (Figura 15 c), e não houve multivalentes.

A partir da contagem dos cromossomos em diacinese verificou-se que 2n = 112é o provável número para essa cultivar, confirmando o observado na análise mitótica. Algumas variações como 114 e 115 cromossomos foram notadas em 20% (1/5) das células, para ambas.

Os resultados obtidos para IACSP95-3018 foram similares aos de IACSP93-3046 em relação à elevada proporção de bivalentes. Todas as cinco células apresentaram de 1 a 2 univalentes (Figura 16 c). Multivalentes foram raros, pois se observou apenas um IV em um meiócito. O número 2n = 104 foi o mais frequente em IACSP95-3018, porém 109 e 110 cromossomos também foram registrados, ambos com frequência de 20% (1/5). Contudo, cabe ressaltar que neste genótipo as células em diacinese apresentaram cromossomos sobrepostos; por isso essas variações no número contado.



Figura 14 - Hibridização in situ fluorescente usando a sonda complementar à região centromérica dos cromossomos de Caiana Fita, em diacinese. Cromossomos contracorados com DAPI (a); Sítios de hibridização da sonda centromérica, em vermelho (b); Sobreposição das imagens, em que foi possível identificar a ocorrência de 40 II (c). Barra = 10 μm



Figura 15 - Hibridização *in situ* fluorescente usando a sonda complementar à região centromérica dos cromossomos de IACSP93-3046, em duas diacineses. Cromossomos contracorados com DAPI (a, d); Sítios de hibridização da sonda centromérica, em vermelho (b, e); Sobreposição das imagens, evidenciando 56 II + 2 I (c) e 56 II (f). As setas indicam os univalentes. Barra = 10 μm



Figura 16 - Hibridização *in situ* fluorescente usando a sonda complementar à região centromérica dos cromossomos de IACSP95-3018, em diacinese. Cromossomos contracorados com DAPI (a); Sítios de hibridização da sonda centromérica, em vermelho (b); Sobreposição das imagens, revelando a ocorrência de 51 II + 2 I (c). As setas indicam os univalentes. Barra = 10 µm

5 DISCUSSÃO

5.1 Análise mitótica da cultivar IACSP93-3046

O número de cromossomos da cultivar IACSP93-3046 (2n = 112) foi descrito, pela primeira vez, neste estudo. O resultado é consistente ao esperado para as variedades modernas de cana-de-açúcar, as quais possuem 2n = 110 a 130 cromossomos, em virtude da sua origem interespecífica e do processo de nobilização (MING et al., 2006; D'HONT, 1996), além das etapas posteriores de melhoramento, que incluem gerações de cruzamentos e seleção (veja Anexo A).

Trabalhos pioneiros, publicados no século 20, determinaram o número de cromossomos das variedades P.O.J. 2722, 2725, 2878 e 2883 (híbridos nobilizados) sendo 2n = 108, 107, 119 e 115, respectivamente (veja Moriya, 1940). Resultado semelhante foi observado para a variedade 85N904 (2n = 110) e para o híbrido MQ66-14 (*S. officinarum* x *S. spontaneum*) com 2n = 112 (JENKIN et al., 1995). O número de cromossomos, variando de 2n = 102 a 119, tem sido frequentemente observado em cultivares de cana-de-açúcar, incluindo aquelas selecionadas em outros países como, por exemplo, R570 que possui 2n = 107-115 (D'HONT et al., 1996) e My5514 com 2n = 103, B42231 com 2n = 110 e C236-51 com 2n = 115 (CUADRADO et al., 2004). Do mesmo modo, Piperidis, Piperidis e D'Hont (2010), relataram que o número de cromossomos de cultivares e clones elites variou de 2n = 106 a 119.

As variedades R, incluindo a R570, são derivadas do programa de seleção conduzido em Reunião, um departamento francês no Oceano Índico. A ilha situa-se a leste de Madagascar e o cultivo de cana-de-açúcar ocupa 79% das terras agrícolas. As variedades My5514, B42231 e C236-51 são provenientes do Instituto Nacional de Pesquisa da Cana-de-açúcar (INICA - Cuba), enquanto as Q117, Q138, Q141, Q155 e Q165 são derivadas de programas conduzidos na Austrália, as NCo310 e NCo376 são da África do Sul. A composição cromossômica de cada cultivar foi proposta quanto à participação de cromossomos de *S. officinarum, S. spontaneum* e de recombinantes, com base em hibridização genômica *in situ* (GISH), confirmando o predomínio de cromossomos de *S. officinarum* (D'HONT, 1996; CUADRADO et al., 2004; PIPERIDIS; PIPERIDIS; D'HONT, 2010).

Até o momento, o número de cromossomos foi definido para seis cultivares brasileiras. No estudo desenvolvido por Kunieda, Aguiar-Perecin e Bassinelo (1984) verificou-se que a variedade IAC4865 possui 2n = 118, enquanto Ferrari (2010) observou 2n = 112 para as cultivares RB72454 e RB835486 e 2n = 110 para RB867515. Recentemente, as variedades IAC911099 e CTC6 foram descritas com 2n = 112 cromossomos (MELLONI, 2014; MELLONI et al., 2016).

A morfologia dos cromossomos de IACSP93-3046 observados no presente estudo mostra que estes são metacêntricos e submetacêntricos, cujo tamanho varia de 1,6 a 3,2 μ m (Figura 5 e Figura 6), corroborando com os resultados obtidos por Ferrari (2010). A autora relata que a maioria dos cromossomos das cultivares RB72454, RB835486 e RB867515 apresentou essa morfologia, e tamanho variando de 1,3 a 4,1 μ m.

Cromossomos da espécie *S. spontaneum* (2n = 40, 54 e 72) foram classificados por Mehra e Sood (1974) como metacêntricos e submetacêntricos, com tamanho variando de 1,28 a 6,90 µm. Posteriormente, essa classificação foi confirmada construindo-se um idiograma para o clone AP85-361 (n = 32), que é derivado da cultura de anteras de SES 208 (2n = 64, forma de *S. spontaneum* coletado originalmente na Índia), porém o tamanho máximo registrado foi de 4 µm (HA et al., 1999).

Na determinação do número de cromossomos de cana-de-açúcar é comum observar variação no número entre as células metafásicas analisadas. A cultivar IACSP93-3046 avaliada neste estudo apresentou 2n = 108-116 e amplitude ou h = 8, resultado este semelhante ao obtido para as cultivares RB72454 (2n = 108-114, h = 6), RB835486 (2n = 101-116, h = 15) e RB867515 (2n = 105-114, h = 9) por Ferreira et al. (2010). Igualmente, Silvarolla e Aguiar-Perecin (1994) verificaram 2n = 112-116, h = 4 para NA56-79 e 2n = 110-115, h = 5 para Co 419.

Além dos aspectos biológicos que decorrem do processo de domesticação que deu origem as canas cultivadas, a partir do fim do século XIX, as variações relatadas são também atribuídas a erros de contagem, devido à sobreposição ou possíveis perdas de cromossomos durante o preparo das lâminas. Assim como, o elevado número de cromossomos, o tamanho pequeno e a morfologia semelhante são outros fatores que contribuem para os erros de contagem (CUADRADO et al., 2004; PIPERIDIS; PIPERIDIS; D'HONT, 2010; MELLONI et al., 2016).

A dificuldade de se obter células metafásicas adequadas para a contagem de cromossomos é normalmente discutida na literatura. A exemplo, Silvarolla e Aguiar-Perecin (1994) classificaram células metafásicas pela soma de valores atribuídos aos caracteres de qualidade, em que uma célula intacta, sem sobreposição de cromossomos e com morfologia evidente era classificada com o maior valor (7). No entanto, apesar dos autores terem obtido células com alta qualidade, somente uma célula atingiu o valor máximo dentre as 59 células avaliadas para a variedade Co 419.

5.2 Comportamento meiótico da cultivar IACSP93-3046

A microsporogênese da cultivar IACSP93-3046 é caracterizada por um elevado percentual (68%) de meiócitos com irregularidades, relativas à segregação dos cromossomos, sobretudo: (*i*) migração precoce para os polos, (*ii*) cromossomos retardatários em anáfase I, telófase I e II, (*iii*) cromossomos perdidos em prófase II e (*iv*) micronúcleos nas tétrades.

A frequência e os tipos de irregularidades observadas em IACSP93-3046 são consistentes com as descritas por Nair (1975), embora analisando híbridos interespecíficos (*S. officinarum*, $2n = 80 \times S$. *spontaneum*, 2n = 54 a 128), especificamente, meiócitos em anáfase I e II, dos quais mais que 50% apresentaram cromossomos retardatários e pontes, e também tétrades com micronúcleos. Do mesmo modo, Bielig et al. (2003) verificaram cromossomos retardatários em telófase I, divisão assíncrona na meiose II, tríades e díades, em nove clones (*Saccharum* spp.).

As cultivares de cana-de-açúcar IAC 51-205, CB 53-98, SP 70-1078 e SP 70-1143 também apresentaram meiócitos com anormalidades, tais como, cromossomos com migração precoce em metáfase I e II, retardatários em anáfase I e II, e a presença de micronúcleos em telófase (I e II). Em todas as cultivares verificaram-se tétrades com micronúcleos, cuja frequência média variou de 53 a 68% (PAGLIARINI et al., 1990).

Estas variedades foram lançadas por entidades brasileiras de pesquisa distintas e, possivelmente, tem diferentes genótipos na composição de suas genealogias: IAC 51-205 foi lançada em 1958, caracterizava-se por elevado teor de açúcar e ser resistente ao mosaico e ao carvão; CB 53-98 foi lançada em 1996 e apresentava bom teor de suco e perfilhamento precoce; e SP 70-1143 foi lançada em 1998.

Irregularidades meióticas em poliploides são comumente relatadas em gramíneas. Exemplificando, o gênero *Brachiaria*, incluindo espécies e híbridos interespecíficos, é bem caracterizado quanto ao comportamento meiótico. Fuzinatto, Pagliarini e Valle (2012) verificaram que as progênies derivadas do cruzamento artificial entre dois acessos africanos de *B. ruziziensis* (R038) e *B. brizantha* (B140), ambos 2n = 4x = 36, apresentaram segregação irregular dos cromossomos, desinapse, orientação anormal do fuso, citocinese anormal, políades e micrócitos, com percentual médio de células irregulares variando de 16,6% a 85,6%. As autoras relataram que a configuração bivalente é predominante, uma vez que os genitores são tetraploides, sendo R038 mantido por sementes, após ter sofrido duplicação cromossômica, e B140 é um tetraploide apomítico natural.

Na meiose I de IACSP93-3046, claramente, observa-se que as irregularidades ocorrem preferencialmente a partir da anáfase I, já que foram registrados poucos meiócitos em metáfase I com irregularidades. Nessa fase verificou-se de 1 a 2 cromossomos com migração precoce, os quais possivelmente são os univalentes, visualizados na diacinese de IACSP93-3046 (Tabela 3 e Figura 15 c). Os univalentes podem decorrer da terminalização precoce ou baixa frequência de quiasmas, e comportam-se migrando precocemente para os polos ou como retardatários em anáfase, resultando na formação de micronúcleos (veja KODURU; RAO, 1981; UTSUNOMIYA; BIONE; PAGLIARINI, 2002).

A presença de bivalentes com disjunção tardia na anáfase I em IACSP93-3046 é possivelmente resultado da diferença no ritmo meiótico dos genomas que constituem a cana-de-açúcar.

De modo semelhante, Ricci et al. (2011) observaram elevada frequência de cromossomos retardatários em anáfase I e II (>60%), na maioria dos híbridos artificiais oriundos do cruzamento entre o acesso sexual H031 de *Urochloa humidicola* e a cultivar apomítica *U. humidicola* BRS Tupi, ambos hexaploides com 2n = 6x = 36. Os autores sugerem que os genomas dos genitores diferem quanto ao ritmo meiótico. Mais tarde, Vigna et al. (2016) analisando os mesmos híbridos, obtiveram resultado similar quanto ao tempo de segregação dos cromossomos em anáfase I. Esses autores propuseram que os genitores H031 e BRS Tupi são alopoliploides naturais, possivelmente derivados do cruzamento entre um diploide

sexual 2n = 2x = 12 (genoma A) e um tetraploide apomítico 2n = 4x = 24 (genoma B). Após a duplicação natural do triploide (2n = 3x = 18) originou-se o alohexaploide (2n = 6x = AABBBB). Deste modo, nas células em anáfase I e II, notou-se que os cromossomos do genoma A possuem disjunção tardia em relação aos do B, em que 6 bivalentes de A se mantinham posicionados na placa equatorial, enquanto 12 de B segregavam para os polos. Apesar do genoma A segregar tardiamente, a maioria dos cromossomos é incluída nos núcleos, porém o restante formaram micronúcleos.

Esse comportamento, típico de alopoliploides artificiais, provavelmente ocorre na cultivar IACSP93-3046, embora a maior parte de seu genoma seja de constituição autopoliploide. Alguns bivalentes segregaram tardiamente e não alcançaram os polos a tempo de serem incluídos nos núcleos, permanecendo dispersos no citoplasma em prófase II. Sugere-se que o ritmo meiótico de *S. officinarum* e *S. spontaneum* possa ser distinto e responsável pela segregação irregular aqui relatada.

A presença de micronúcleos nas tétrades é um indicativo de eliminação de cromossomos que, em consequência, geram micrósporos aneuploides. A evidencia de aneuploidia em progênies de cana-de-açúcar é comumente relatada em estudos genéticos (veja GARCIA et al., 2013).

Em hexaploides de *Pennisetum purpureum* x *P. glaucum* notou-se haver correlação positiva entre irregularidades na meiose e inviabilidade dos grãos de pólen, demonstrando que a instabilidade da meiose compromete a viabilidade polínica como consequência da produção de gametas desbalanceados (PAIVA et al., 2012). Contudo, esse não é o caso da cultivar IACSP93-3046, que embora apresente altos índices de irregularidade meiótica e possíveis micrósporos aneuploides, possui alta viabilidade polínica e é usada como progenitor masculino no Programa de Melhoramento de Cana do IAC (XAVIER, M. A., comunicação pessoal). O grau de autopoliploidia da cana-de-açúcar justifica a alta viabilidade dos grãos de pólen, sendo que essa hipótese já foi proposta por Nair (1972a) em grãos de pólen *S. spontaneum*, (2n = 40 a 128), mesmo com aneuploidias.

5.3 Associações cromossômicas identificadas por FISH

Os estudos que descrevem o pareamento dos cromossomos meióticos em cana-de-açúcar são unanimes quanto à prevalência de bivalentes e à menor

proporção de univalentes e multivalentes. Esses resultados são relatados tanto para as espécies, os híbridos interespecíficos (*S. officinarum* e *S. spontaneum*) e para as variedades modernas, porém poucos genótipos têm sido analisados. Entretanto, a dificuldade em identificar as configurações meióticas com precisão sempre foi um entrave nos estudos citogenéticos envolvendo os diferentes táxons de *Saccharum*.

Desde os trabalhos clássicos de Bremer (1961b), se tem relatado a ocorrência de pareamento bivalente nas espécies de *Saccharum* e híbridos de *S. officinarum* x *S. spontaneum*. Price (1963b) também observou associação bivalente em mais de 95% dos cromossomos de híbridos com 2n = 112 e 136. Nair (1975) descreveu a prevalência de bivalentes, a ocorrência de univalentes e raros multivalentes em híbridos contendo 2n = 86 e 143.

Os resultados obtidos nesse estudo, com uso da hibridação *in situ* fluorescente, comprovam que os cromossomos de IACSP93-3046, IACSP95-3018 e Caiana Fita se associam em bivalentes na meiose I. Assim, a hipótese de haver um mecanismo que suprime as associações multivalentes se torna mais evidente, embora a ocorrência de recombinantes relatada por D'Hont et al. (1996) e por Piperidis, Piperidis e D'Hont (2010) indique que os genomas apresentam alguma afinidade de pareamento.

A complexidade do genoma das variedades modernas pode ser resumida pela composição predominantemente autopoliploide (derivada da transmissão 2n + n de *S. officinarum*), 15 a 27,5% de cromossomos de *S. spontaneum*, dos quais 10 a 23% de cromossomos íntegros e 8 a 13% de recombinantes. Estas percentagens variam em função do genótipo analisado (PIPERIDIS; PIPERIDIS; D'HONT, 2010).

A não detecção de configurações multivalentes se deve possivelmente a mecanismos que tem sido descritos nas últimas décadas em híbridos sintetizados *de novo*. Assim, é consenso que a alopoliploidia requer a adaptação de dois genomas, envolvendo mudanças na sua programação genética e epigenética durante as etapas iniciais, em seguida da fusão gamética. Isto tem sido reportado, por exemplo, em híbridos ressintetizados de *Brassica* (LUKENS et al., 2006), inclusive com efeitos na expressão gênica e no fenótipo (GAETA et al., 2007).

Interessantemente, dados recentes tem mostrado o papel de micro RNAs durante a hibridação interespecífica e a poliploidização, servindo como molécula tampão contra o choque de genomas. A herança estável de siRNAs manteria a estabilidade da cromatina e do genoma enquanto a variação em miRNAs levaria à

mudanças na expressão gênica, vigor e adaptação em *Arabidopsis*, por exemplo (HA et al., 2009).

No que tange explicitamente ao pareamento meiótico, rearranjos cromossômicos ocorrem rapidamente em resposta à hibridação interespecífica, translocações intergenômicas, envolvendo cromossomos homo(eo)logos, além de *homo(eo)logous shuffling*. Estes eventos tem sido relatados em alopoliploides ressintetizados como em *Arabidopsis suecica* (PONTES et al., 2004), *Brassica napus* (XIONG; GAETA; PIRES, 2011) e em *Trapopogum miscellus* (CHESTER et al., 2012) e devem explicar em parte o que se dá em cana-de-açúcar, já que esses rearranjos ocorrem no sentido de evitar pareamentos multivalentes.

Por outro lado, pressupõe-se que a maioria do pareamento bivalente se dá entre os pares de cromossomos que compõem os genomas das espécies genitoras, porém parte dos bivalentes seria composta de homo(eo)logos, assegurando a regularidade da segregação meiótica das variedades modernas e a sua fertilidade. Eventualmente formam-se multivalentes, como constatado em IACSP95-3018, em decorrência da homo(oe)logia que ainda persiste na composição do genoma das canas modernas.

Importante ressaltar que as irregularidades cromossômicas aqui relatadas não seriam, portanto, decorrentes do pareamento multivalente, mas da divisão celular assíncrona típica das espécies genitoras.

6 CONCLUSÕES

O número de cromossomos da cultivar IACSP93-3046 é 2*n* = 112, sendo esta determinação inédita.

O percentual de irregularidades da microsporogênese da cultivar IACSP93-3046 é elevado. Essas são decorrentes da disjunção tardia de bivalentes na anáfase I da meiose. Sugere-se que há assincronia no tempo de divisão celular entre as espécies genitoras da cana. Esse atraso gera as demais irregularidades observadas nas fases subsequentes da meiose I e II, as quais permanecem até as tétrades resultando na perda de cromossomos e aneuploidias.

O uso da hibridização *in situ* fluorescente permite a identificação com precisão do pareamento cromossômico em IACSP93-3046, IACSP95-3018 e Caiana Fita. Nos três genótipos há predomínio de associação do tipo bivalente, evidenciando que ocorre um controle para evitar a formação de multivalentes e assegurar uma meiose mais estável, similar ao já identificado em trigo.

REFERÊNCIAS

AITKEN, K.S.; MCNEIL, M.D.; HERMANN, S.; BUNDOCK, P.C.; KILIAN, A.; HELLER-USZYNSKA, K.; HENRY, R. LI, J. A comprehensive genetic map of sugarcane that provides enhanced map coverage and integrates high-throughput Diversity Array Technology (DArT) markers. **BMC Genomics**, London, v. 15, p. 152, 2014. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-15-152>. Acesso em: 05 junho 2016.

ARCENEAUX, G. Cultivated sugarcanes of the world and their botanical derivation. **Proceedings of the International Society of Sugar and Sugar Cane Technologists**, San Juan, v. 12, p. 844-854, 1967.

BIELIG, L.M.; MARIANI, A.; BERDING, N. Cytological studies of 2n male gamete formation in sugarcane, *Saccharum* L. **Euphytica**, Dordrecht, v. 133, n. 1, p. 117-124, 2003. Disponível em: http://doi.org/10.1023/A:1025628103101. Acesso em: maio 2016.

BRANDES, E.W.; SARTORIS, G.B. Sugarcane: its origin and improvement. In: UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. **Yearbook of the United States Department of Agriculture**. Washington: Government Printing Office, 1936. p. 561-623.

BREMER, G. Short remarks on the cytology of *Saccharum*. In: CONGRESS OF THE INTERNATIONAL SOCIETY OF SUGAR CANE TECHNOLOGISTS, 3., 1929, Soerabaia. **Proceedings...** Soerabaia: General Syndicate of Sugar Manufacturers in the Dutch East Indies, 1929. p. 403-408.

BREMER, G. On the somatic chromosome numbers of sugar-cane forms and the chromosome numbers of indigenous Indian canes. In: CONGRESS OF THE INTERNATIONAL SOCIETY OF SUGAR CANE TECHNOLOGISTS, 4., 1932, San Juan. **Proceedings...** San Juan: Department of Agriculture and Commerce of Puerto Rico, 1932. p. 1-3. (Bulletin, 20).

BREMER, G. Problems in breeding and cytology of sugar cane. I. A short history of sugar cane breeding the original forms of *Saccharum*. **Euphytica**, Dordrecht, v. 10, n. 1, p. 59-78, 1961a. Disponível em: http://doi.org/10.1007/BF00037206>. Acesso em: 01 maio 2016.

_____. Problems in breeding and cytology of sugar cane. II. The sugar cane breeding from a cytological view-point. **Euphytica**, Dordrecht, v. 10, n. 2, p. 121-133, 1961b. Disponível em: < http://link.springer.com/article/10.1007/BF00022203>. Acesso em: 01 maio 2016.

BURNER, D.M. Cytogenetic analyses of sugarcane relatives (Andropogoneae: Saccharinae). **Euphytica**, Dordrecht, v. 54, n. 1, p. 125-133, 1991. Disponível em: http://doi.org/10.1007/BF00145639. Acesso em: 01 maio 2016.

BURNER, D.M.; LEGENDRE, B.L. Cytogenetic and fertility characteristics of elite sugarcane clones. **Sugar Cane**, High Wycombe, v. 1, p. 6-10, 1994.

CAI, X.; XU, S. Meiosis-driven genome variation in plants. **Current Genomics**, Bethesda, v. 8, n. 3, p. 151-161, 2007.

CHEAVEGATTI-GIANOTTO, A.; ABREU, H.M.C.; ARRUDA, P.; BESPALHOK FILHO, J.C.; BURNQUIST, W.L.; CRESTE, S.; DI CIERO, L.; FERRO, J.A.; FIGUEIRA, A.V.O.; FILGUEIRAS, T.S.; GROSSI-DE-SÁ, M.F.; GUZZO, E.C.; HOFFMANN, H.P.; LANDELL, M.G.A.; MACEDO, N.; MATSUOKA, S.; REINACH, F.C.; ROMANO, E.; SILVA, W.J.; SILVA FILHO, M.C.; ULIAN, E.C. Sugarcane (*Saccharum* x *officinarum*): a reference study for the regulation of genetically modified cultivars in Brazil. **Tropical Plant Biology**, New York, v. 4, n. 1, p. 62-89, 2011. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1007/s12042-011-9068-3. Acesso em: 01 maio 2016.

CHESTER, M.; GALLAGHER, J.P.; SYMONDS, V.V.; SILVA, A.V.C.; MAVRODIEV, E.V.; LEITCH, A.R.; SOLTIS, P.S. SOLTIS, D.E. Extensive chromosomal variation in a recently formed natural allopolyploid species, *Tragopogon miscellus* (Asteraceae). **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 109, n. 4, p. 1176-1181, 2012. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1112041109>. Acesso em: 10 maio 2016.

COMAI, L. The advantages and disadvantages of being polyploid. **Nature Reviews Genetics**, London, v. 6, p. 836-846, 2005. Disponível em: http://doi.org/10.1038/nrg1711>. Acesso em: 01 maio 2016.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira:** cana-de-açúcar, 4º levantamento da safra 201/2016, abril/2016. Brasília, 2016. 76 p. Disponível em: http://www.conab.gov.br. Acesso em: 02 maio 2016.

CORDEIRO, G.; AMOUYAL, O.; ELIOTT, F.; HENRY, R. Sugarcane. In: KOLE, C. (Ed.). **Genome mapping and molecular breeding in plants**: pulses, sugar and tuber crops. Berlin: Springer-Verlag, 2007. p. 175-203.

CUADRADO, A.; ACEVEDO, R.; ESPINA, S.M.D. de la, JOUVE, N.; TORRE, C. de la. Genome remodelling in three modern *S. officinarum* x *S. spontaneum* sugarcane cultivars. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 55, n. 398, p. 847-854, 2004. Disponível em: http://doi.org/10.1093/jxb/erh093>. Acesso em: 02 maio 2016.

D'HONT, A. Unraveling the genome structure of polyploids using FISH and GISH: examples of sugarcane and banana. **Cytogenetic and Genome Research**, Basel, v. 109, n. 1/3, p. 27-33, 2005. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1159/000082378>. Acesso em: 14 abr. 2016.

D'HONT, A.; PAULET, F.; GLASZMANN, J.C. Oligoclonal interspecific origin of 'North Indian' and 'Chinese' sugarcanes. **Chromossome Research**, Oxford, v. 10, n. 3, p. 253-262, 2002. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1023/A:1015204424287>. Acesso em: 05 maio 2016.

68

D'HONT, A.; ISON, D.; ALIX, K.; ROUX, C.; GLASZMANN, J.C. Determination of basic chromosome numbers in the genus *Saccharum* by physical mapping of ribosomal RNA genes. **Genome**, Ottawa, v. 41, n. 2, p. 221-225, 1998. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1139/g98-023>. Acesso em: 03 maio 2016.

D'HONT, A.; GRIVET, L.; FELDMANN, P.; RAO, S.; BERDING, N.; GLASZMANN, J.C. Characterization of the double genome structure of modern sugarcane cultivars (*Saccharum* spp.) by molecular cytogenetic. **Molecular and General Genetics**, New York, v. 250, n. 4, p. 405-413, 1996. Disponível em: . Acesso em: 05 maio 2016.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, Rockville, v. 12, n. 1, p. 13-15, 1990.

FAO. **FAOSTAT**. Disponível em: <http://faostat3.fao.org/faostatgateway/go/to/browse/rankings/commodities_by_regions/E>. Acesso em: 10 maio 2016.

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

FUZINATTO, V.A.; PAGLIARINI, M.S.; VALLE, C.B.D. Meiotic behavior in apomictic *Brachiaria ruziziensis* × *B. brizantha* (Poaceae) progenies. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 69, p. 380-385, 2012.

GAETA, R.T.; PIRES, J.C.; INIGUEZ-LUY, F.; LEON, E.; OSBORN, T.C. Genomic changes in resynthesized *Brassica napus* and their effect on gene expression and phenotype. **Plant Cell**, Rockville, v. 19, n. 11, p. 3403-3417, 2007. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1105/tpc.107.054346. Acesso em: 10 maio 2016.

GARCIA, A.A.F.; KIDO, E.A.; MEZA, A.N.; SOUZA, H.M.B.; PINTO, L.R.; PASTINA, M.M.; LEITE, C.S.; SILVA, J.A.G.; ULIAN, E.C.; FIGUEIRA, A.; SOUZA, A.P. Development of an integrated genetic map of a sugarcane (Saccharum spp.) commercial cross, based on a maximum-likelihood approach for estimation of linkage and linkage phases. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 112, n. 2, p. 298-314, 2006. Disponível em: http://dx.doi.or/10.1007/s00122-005-0129-6>. Acesso em: 5 maio 2016.

GARCIA, A.A.F.; MOLLINARI, M.; MARCONI, T.G.; SERANG, O.R.; SILVA, R.R.; VIEIRA, M.L.C.; VICENTINI, R.; COSTA, E.A.; MANCINI, M.C.; GARCIA, M.O.S.; PASTINA, M.M.; GAZAFFI, R.; MARTINS, E.R.F.; DAHMER, N.; SFORÇA, D.A.; SILVA, C.B.C.; BUNDOCK, P.; HENRY, R.J.; SOUZA, G.M.; VAN SLUYS, M.A.; LANDELL, M.G.A.; CARNEIRO, M.S.; VINCENTZ, M.A.G.; PINTO, L.R.; VENCOVSKY, R.; SOUZA, A.P. SNP genotyping allows an in-depth characterisation of the genome of sugarcane and other complex autopolyploids. **Scientific Reports**, London, v. 3, p. 1-10, 2013. Disponível em: http://dx.doi.or/10.1038/srep03399>. Acesso em: 10 maio 2016. GRIVET, L.; DANIELS, C.; GLASZMANN, J.C.; D'HONT, A. A review of recent molecular genetics evidence for sugarcane evolution and domestication. **Ethnobotany Research and Applications**, Honolulu, v. 2, p. 9-17, 2004.

GUERRA, M.S. Reviewing the chromosome nomenclature of Levan et al. **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v. 9, n. 4, p. 741-743, 1986.

HA, S.; MOORE, P.H.; HEINZ, D.; KATO, S.; OHMIDO, N.; FUKUI, K. Quantitative chromosome map of the polyploid *Saccharum spontaneum* by multicolor fluorescence in situ hybridization and imaging methods. **Plant Molecular Biology**, Norfolk, v. 39, n. 6, p. 1165-1173, 1999. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1023/A:1006133804170>. Acesso em: 10 maio 2016.

HA, M.; LU, J.; TIAN, L.; RAMACHANDRAN, V.; KASSCHAU, K.D.; CHAPMAN, E.J.; CARRINGTON, J.C.; CHEN, X.; WANG, X.J.; CHEN, Z.J. Small RNAs serve as a genetic buffer against genomic shock in *Arabidopsis* interspecific hybrids and allopolyploids. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.106, n. 42, p. 17835-17840, 2009. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0907003106>. Acesso em: 10 maio 2016.

HOANG, N.V.; FURTADO, A.; BOTHA, F.C.; SIMMONS, B.A.; HENRY, R.J. Potential for genetic improvement of sugarcane as a source of biomass for biofuels. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, Lausanne, v. 3, p. 1-15, 2015. Disponível em: http://dx.doi.org/10.3389/fbioe.2015.00182>. Acesso em: 11 maio 2016.

JENKIN, M.J.; READER, S.M.; PURDIE, K.A.; MILLER, T.E. Detection of rDNA sites in sugarcane by FISH. **Chromosome Research**, Oxford, v. 3, n. 7, p. 444-445, 1995.

JERIDI, M.; PERRIER, X.; RODIER-GOUD, M.; FERCHICHI, A.; D'HONT, A.; BAKRY, F. Cytogenetic evidence of mixed disomic and polysomic inheritance in an allotetraploid (AABB) *Musa* genotype. **Annals of Botany**, London, v. 110, n. 8, p. 1593-1606, 2012. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1093/aob/mcs220>. Acesso em: 11 maio 2016.

KODURU, P.; RAO, M.K. Cytogenetics of synaptic mutants in higher plants. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 59, n. 4, p. 197-214, 1981.

KUNIEDA, M.K.; AGUIAR-PERECIN, M.L.R.; BASSINELO, A.I. Caracterização do número de cromossomos de duas variedades de cana-de-açucar cultivada no Brasil. In: I COLÓQUIO SOBRE CITOGENÉTICA E EVOLUÇÃO DE PLANTAS, Piracicaba – SP: Departamento de Genética, ESALQ/USP, 1984. p. 46-46.

LANDELL, M.G.A.; CAMPANA, M.P.; FIGUEIREDO, P.; SILVA, M.A.; VASCONCELOS, A.C.M. **Variedades de cana-de-açúcar para o Centro-Sul do Brasil:** 15^a liberação do programa cana IAC. Campinas: IAC, 2005. 32 p. (IAC. Boletim Técnico, 197). LUKENS, L.N.; PIRES, J.C.; LEON, E.; VOGELZANG, R.; OSLACH, L.; OSBORN, T. Patterns of sequence loss and cytosine methylation within a population of newly resynthesized *Brassica napus* allopolyploids. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 140, n. 1, p. 336-348, 2006. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1104/pp.105.066308>. Acesso em: 12 maio 2016.

MANCINI, M.C.; LEITE, D.C.; PERECIN, D.; BIDÓIA, M.A.P.; XAVIER, M.A.; LANDELL, M.G.A.; PINTO, L.R. Characterization of the genetic variability of a sugarcane commercial cross through yield components and quality parameters. **Sugar Tech**, New Delhi, v. 14, n. 2, p. 119-125, 2012.

MEHRA, P.N.; SOOD, O.P. Floating chromosomal populations in *Saccharum spontaneum* L. **Cytologia**, Tokyo, v. 39, n. 4, p. 681-696, 1974. Disponível em: http://doi.org/10.1508/cytologia.39.681. Acesso em: 11 maio 2016.

MELLONI, M.N.G. **Caracterização molecular, citogenética e fenotípica de acessos do "complexo Saccharum" para fins de introgressão genética**. 2014. 134 p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita FIlho", Jaboticabal, 2014.

MELLONI, M.N.G.; MELLONI, M.L.G.; NEUBER, A.C.; PERECIN, D.; LANDELL, M.G.A.; PINTO, L.R. Efficiency of different antimitotics in cytological preparations of sugarcane. **Sugar Tech**, New Delhi, v. 18, n. 2, p. 222-228, 2016. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1007/s12355-015-0381-2>. Acesso em: 15 maio 2016.

MENDES-BONATO, A.B.; JUNQUEIRA FILHO, R.G.; PAGLIARINI, M.S, VALLE, C.B.; PENTEADO, M.I.O. Unusual cytological patterns of microsporogenesis in Brachiaria decumbens: abnormalities in spindle and defective cytokinesis causing precocious cellularization. **Cell Biology International**, London, v. 26, n. 7, p. 641-646, 2002a. Disponível em: http://dx.doi.or/10.1006/cbir.2002.0929>. Acesso em: 15 maio 2016.

MENDES-BONATO, A.B.; PAGLIARINI, M.S.; FORLI, F.; VALLE, C.B.; PENTEADO, M.I.O. Chromosome numbers and microsporogenesis in *Brachiaria brizantha* (Gramineae). **Euphytica**, Dordrecht, v. 125, n. 3, p. 419-425, 2002b. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1023/A:1016026027724>. Acesso em: 15 maio 2016.

MENDES-BONATO, A.B.; RISSO-PASCOTTO, C.; PAGLIARINI, M.S.; VALLE, C.B. Chromosome number and meiotic behavior in *Brachiaria jubata* (Gramineae). **Journal of Genetics**, Bangalore, v. 85, n. 1, p. 83-87, 2006.

MING, R.; MOORE, P.H.; WU, K.; D'HONT, A.; GLASZMANN, J.C.; TEW, T.L.; MIRKOV, T.E.; SILVA, J.; JIFON, J.; RAI, M.; SCHNELL, R.J.; BRUMBLEY, S.M.; LAKSHMANAN, P.; COMSTOCK, J.C.; PATERSON, A.H. Sugarcane improvement through breeding and biotechnology. In: JANICK, J. (Ed.). **Plant breeding reviews**. New Jersey: John Wiley, 2006. p. 15-118.
MOORE, P.H.; PATERSON, A.H.; TEW, T. Sugarcane: the crop, the plant, and domestication. In: MOORE, P.H.; BOTHA, F.C. (Eds). **Sugarcane: Physiology, Biochemistry and Functional Biology**. Oxford: Wiley Blackwell, 2014. p 1-17.

MORIYA, A. List of chromosome numbers in the genus *Saccharum* and related genera. **The Japanese Journal of Genetics**, Mishima, v. 16, n. 3, p. 126-136, 1940. Disponível em: http://doi.org/10.1266/jjg.16.126>. Acesso em: 16 maio 2016.

MUKHERJEE, S.K. Origin and distribution of Saccharum. **Botanical Gazette**, Chicago, v. 119, n. 1, p. 55-61, 1957. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1086/335962. Acesso em: 16 maio 2016.

MURATA, M.; MOTOYOSHI, F. Floral chromosomes of *Arabidopsis thaliana* for detecting low-copy DNA sequences by fluorescence in situ hybridization. **Chromosoma**, New York, v. 104, n. 1, p. 39-43, 1995.

NAGAKI, K.; TSUJIMOTO, H.; SASAKUMA, T. A novel repetitive sequence of sugar cane, SCEN family, locating on centromeric regions. **Chromosome Research**, Dordrecht, v. 6, n. 4, p. 295-302, 1998.

NAIR, M.K. Cytogenetics of *Saccharum officinarum* L. and *S. spontaneum* L. IV. Chromosome number and meiosis in *S. officinarum* x *S. spontaneum* hybrids. **Caryologia**, Florence, v. 28, n. 1, p. 1-14, 1975. Disponível em: http://doi.org/10.1080/00087114.1975.10796591>. Acesso em: 16 maio 2016.

NAIR, M.K. Cytogenetics of *Saccharum officinarum* L., *Saccharum spontaneum* L. and *S. officinarum* x *S. spontaneum* hybrids. I. Chromosome mosaics. **Cytologia**, Tokyo, v. 37, n. 4, p. 565-573, 1972a. Disponível em: . Acesso em: 16 maio 2016.

_____. Cytogenetics of *Saccharum*. III. Karyotype analysis and meiosis in *S. spontaneum*. **Nucleus**, Calcutta, v. 15, n. 2, p. 107-117, 1972b.

NISHIYAMA, I. Basic numbers in the polyploidy of *Saccharum*. **Journal of Heredity**, Cary, v. 47, n. 2, p. 91-99, 1956.

OKURA, V.K.; SOUZA, R.S.C.; TADA, S.F.S.; ARRUDA, P. BAC-pool sequencing and assembly of 19 Mb of the complex sugarcane genome. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 7, p. 1-8, 2016. Disponível em: http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2016.00342>. Acesso em: 02 junho 2016.

PAGLIARINI, M.S.; SILVA, S.P.; MOLLINARI, R. Análise meiótica em cultivares de cana-de-açúcar. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, Curitiba, v. 33, p. 283-293, 1990.

PAIVA, E.A.; BUSTAMANTE, F.O.; BARBOSA, S.; PEREIRA, A.V.; DAVIDE, L.C. Meiotic behavior in early and recent duplicated hexaploid hybrids of napier grass (*Pennisetum purpureum*) and pearl millet (*Pennisetum glaucum*). **Caryologia**, Florence, v. 65, n. 2, p. 114-120, 2012.

PALHARES, A.C.; RODRIGUES-MORAIS, T.B.; SLUYS, M.A.V.; DOMINGUES, D.S.; MACHERONI JÚNIOR, W.; JORDÃO JÚNIOR, H.; SOUZA. A.P.; MARCONI, T.G.; MOLLINARI, M.; GAZAFFI, R.; GARCIA, A.A.F.; VIEIRA, M.L.C. A novel linkage map of sugarcane with evidence for clustering of retrotransposon-based markers. **BMC Genomics**, London, v. 13, p. 51, 2012. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1186/1471-2156-13-51. Acesso em: 14 maio 2016.

PANJE, R.R.; BABU, C.N. Studies in Saccharum spontaneum distribution and geographical association of chromosome numbers. **Cytologia**, Tokyo, v. 25, n. 2, p. 152-172, 1960.

PIPERIDIS, G.; PIPERIDIS, N.; D'HONT, A. Molecular cytogenetic investigation of chromosome composition and transmission in sugarcane. **Molecular Genetics and Genomics**, Heidelberg, v. 284, n. 1, p. 65-73, 2010. Disponível em: . Acesso em: 17 maio 2016.

PONTES, O.; NEVES, N.; SILVA, M.; LEWIS, M.S.; MADLUNG, A.; COMAI, L.; VIEGAS, W.; PIKAARD, C.S. Chromosomal locus rearrangements are a rapid response to formation of the allotetraploid *Arabidopsis suecica* genome. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 101, n. 52, p. 18240-18245, 2004. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0407258102>. Acesso em: 17 maio 2016.

PRICE, S. Cytological studies in *Saccharum* and allied genera. III. Chromosome numbers in interspecific hybrids. **Botanical Gazette**, Chicago, v. 118, n. 3, p. 146-159, 1957. Disponível em: http://www.jstor.org/stable/2473491. Acesso em: 18 maio 2016.

_____. Cytological studies in *Saccharum* and allied genera. VII. Maternal chromosome transmission by *S. officinarum* in intra-and interspecific crosses. **Botanical Gazette**, Chicago, v. 122, n. 4, p. 298-305, 1961. Disponível em: http://www.jstor.org/stable/2473162>. Acesso em: 18 maio 2016.

_____. Cytogenetics of modern sugar canes. **Economic Botany**, New York, v. 17, n. 2, p. 97-106, 1963a. Disponível em: http://doi.org/10.1007/BF02985359. Acesso em: 18 maio 2016.

_____. Cytological studies in *Saccharum* and allied genera. VIII. F₂ and BC₁ progenies from 112- and 136 chromosome *S. officinarum* x *S. spontaneum* hybrids. **Botanical Gazette**, Chicago, v. 124, n. 3, p. 186-190, 1963b. Disponível em: http://www.jstor.org/stable/2473512>. Acesso em: 18 maio 2016.

_____. Cytology of Chinese and North Indian sugarcane. **Economic Botany**, Bronx, v. 22, n. 2, p. 155-164, 1968. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/BF02860559>. Acesso em: 18 maio 2016. RICCI, G.L.; SOUZA-KANESHIMA, A.M.; PAGLIARINI, M.S.; VALLE, C.B. Meiotic behavior in *Brachiaria humidicola* (Poaceae) hybrids. **Euphytica**, Dordrecht, v. 182, n. 3, p. 355-361, 2011.

RILEY, R.; CHAPMAN, V. Genetic control of the cytologically diploid behaviour of hexaploid wheat. **Nature**, London, v. 182, p. 713-715, 1958. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1038/182713a0>. Acesso em: 18 maio 2016.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular cloning:** a laboratory manual. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 2344 p.

SCHWARZACHER, T.; HESLOP-HARRISON, P. **Practical** *in situ* hybridization. Oxford: BIOS Scientific, 2000. 203 p.

SETTA, N.; MONTEIRO-VITORELLO, C.B.; METCALFE, C.J; CRUZ, G.M.Q.; DEL BEM, L.E.; VICENTINI, R.; NOGUEIRA, F.T.S; CAMPOS, R.A.; NUNES, S.L.; TURRINI, P.C.G.; VIEIRA, A.P.; CRUZ, E.A.O.; CORRÊA, T.C.S.; HOTTA, C.T.; VARANI, A.M.; VAUTRIN, S.; TRINDADE, A.S.; VILELA, M.M.; LEMBKE, C.G.; SATO, P.M.; ANDRADE, R.F.; NISHIYAMA JUNIOR, M.Y.; CARDOSO-SILVA, C.B.; SCORTECCI, K.C.; GARCIA, A.A.F.; CARNEIRO, M.S.; KIM, C.; PATERSON, A.H.; BERGÈS, H.; D'HONT, A.; SOUZA, A.P.; SOUZA, G.M.; VINCENTZ, M.; KITAJIMA, J.P.; SLUYS, M.A.V. Building the sugarcane genome for biotechnology and identifying evolutionary trends. **BMC Genomics**, London, v. 15, n. 540, p. 1-17, 2014.

SHARMA, A.K.; SHARMA, A. **Chromosome techniques:** theory and practice. 3rd ed. London: Butterworths, 1980. 711 p.

SILVAROLLA, M.B.; AGUIAR-PERECIN, M.L.R.; Evaluation of chromosome number stability in two sugarcane varieties. **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v. 17, n. 2, p. 237-242, 1994.

SIMMONDS, N.W. Sugarcanes. In: _____. **Evolution of crop plants**. London: Longman, 1979. p. 104-108.

SINGH, R.J. Plant cytogenetics. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press, 2003. 463 p.

SONG, J.; YANG, X.; RESENDE JUNIOR, M.F.R.; NEVES, L.G.; TODD, J.; ZHANG, J.; COMSTOCK, J.C.; WANG, J. Natural allelic variations in highly polyploidy Saccharum complex. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 7, p. 1-18, 2016. Disponível em: http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2016.00804>. Acesso em: 15 junho 2016.

SREENIVASAN, T.V.; JAGATHESAN, D. Meiotic abnormalities in *Saccharum spontaneum*. **Euphytica**, Dordrecht, v. 24, n. 2, p. 543-549, 1975. Disponível em: http://doi.org/10.1007/BF00028230>. Acesso em: 18 maio 2016.

SREENIVASAN, T.V.; SREENIVASAN, J. Cytology of *Saccharum* complex from New Guinea, Indonesia and India. **Caryologia**, Florence, v. 37, n. 4, p. 351-357, 1984. Disponível em: http://doi.org/10.1080/00087114.1984.10797713. Acesso em: 18 maio 2016.

SUZUKI, E. Cytological studies of sugar cane. I. Observations on some POJ varieties. **Cytologia**, Tokyo, v. 11, n. 4, p. 507-514.,1941. Disponível em: http://doi.org/10.1508/cytologia.11.507>. Acesso em: 18 maio 2016.

THUMJAMRAS, S.; IAMTHAM, S.; PRAMMANEE, S.; JONG, H. Meiotic analysis and FISH with rDNA and rice BAC probes of the Thai KPS 01-01-25 sugarcane cultivar. **Plant Systematics and Evolution**, New York, v. 302, n. 3, p. 305-317, 2016. Disponivel em: http://dx.doi.org/10.1007/s00606-015-1264-4. Acesso em: 14 abr. 2016.

TOMKINS, J.P.; YU, Y.; MILLER-SMITH, H.; FRISCH, D.A.; WOO, S.S.; WING, R.A. A bacterial artificial chromosome library for sugarcane. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 99, n. 3, p. 419-424, 1999.

TSURUTA, S.; EBINA, M.; KOBAYASHI, M.; HATTORI, T.; TERAUCHI, T. Analysis of genetic diversity in the bioenergy plant Erianthus arundinaceus (poaceae: Andropogoneae) using amplified fragment length polymorphism markers. **Grassland Science**, Tochigi, v. 58, n. 3, p. 174-177, 2012. Disponível em: ">http://dx.doi.org/10.1111/j.1744-697X.2012.00258.x>. Acesso em: 12 abril 2016.

UTSUNOMIYA, K.S.; BIONE, N.C.P.; PAGLIARINI, M.S. How many different kinds of meiotic abnormalities could be found in a unique endogamous maize plant? **Cytologia**, Tokyo, v. 67, n. 2, p. 169-176, 2002.

VIGNA, B.B.; SANTOS, J.C.; JUNGMANN, L.; VALLE, C.B.; MOLLINARI, M.; PASTINA, M.M.; PAGLIARINI, M.S.; GARCIA, A.A.; SOUZA, A.P. Evidence of allopolyploidy in *Urochloa humidicola* based on cytological analysis and genetic linkage mapping. **Plos One**, San Francisco, v. 11, n. 4, p. 1-23, 2016.

XIONG, Z.; GAETA, R.T.; PIRES, J.C. Homoeologous shuffling and chromosome compensation maintain genome balance in resynthesized allopolyploid *Brassica napus*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 108, n. 19, p. 7908–7913, 2011. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1073/pnas.101413810>. Acesso em: 18 maio 2016.

YOUSAFZAI, F.K.; AL-KAFF, N.; MOORE G. The molecular features of chromosome pairing at meiosis: the polyploid challenge using wheat as a reference. **Functional and Integrative Genomics**, Berlin, v. 10, n. 2, p. 157-156, 2010. Disponível em: http://dx.doi.org:10.1007/s10142-010-0171-6. Acesso em: 18 maio 2016.

ANEXOS

Anexo A - Genealogia das cultivares IACSP93-3046 (a) e IACSP95-3018 (b) fornecidas pelo Centro APTA Cana – Instituto Agronômico de Campinas



CP44154

CO281

CP27108

CP36138

F31962

US1694

POJ2878

POJ213

BLACKCHERI

CHUNNEE

ASHYMAURITIUS

S.SPONTAE

CP1165

POJ2725