

**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**

Orientador:  
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**

*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!

## SUMÁRIO

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 <i>Saccharum</i> e o genoma da cana-de-açúcar.....	18
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 ( <i>smear</i> ) ...	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 Ensaio 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 Ensaio de FISH .....	57
5 DISCUSSÃO .....	63
5.1 Análise mitótica da cultivar IACSP93-3046 .....	63
5.2 Comportamento meiótico da cultivar IACSP93-3046 .....	65
5.3 Associações cromossômicas identificadas por FISH .....	68
6 CONCLUSÕES .....	71
REFERÊNCIAS .....	73
ANEXOS .....	83



## 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. Além disso, as genealogias contemplam cruzamentos entre genótipos e eventualmente espécies, todos com elevado grau de ploidia e número de cromossomos distintos, assim como 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, pré-tratado com 8-hidroxiquinolina (0,03%, 4h), e corado pelo método de Feulgen. As células metafásicas foram analisadas sob microscopia óptica, preferencialmente intactas e com o mínimo de sobreposição de cromossomos. Para a análise do comportamento meiótico utilizou-se 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, preparações dos genótipos IACSP93-3046, IACSP95-3018 e Caiana Fita foram realizadas pelo gotejamento de uma suspensão de células em diacinese. As sondas foram obtidas por PCR a partir da amplificação da região centromérica de cana-de-açúcar, marcadas com digoxigenina-11-dUTP, por *nick translation*, e detectadas com anti-digoxigenina-rodamina. 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 microsporogênese de IACSP93-3046 apresentou elevado percentual de irregularidades (68%). De modo geral, as anormalidades foram relativas à segregação dos cromossomos, e incluíram migração precoce para os polos em metáfase I e II, cromossomos retardatários em anáfase (I e II) 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. 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 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, pretreated with 8-hydroxyquinoline 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 by PCR, with amplification of the centromere region, and labeled with digoxigenin-11-dUTP, by nick translation, and detected with anti-digoxigenin-rhodamine. 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 producing 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 se 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 ( $2n$ ) por parte de *S. officinarum* (genitor feminino) nas gerações  $F_1$  e  $RC_1$ , 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, que é atípica, 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. De modo que, 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 um 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).

## 6 CONCLUSÕES

O número de cromossomos para a cultivar IACSP93-3046 é  $2n = 112$ , sendo esta determinação inédita.

O percentual de irregularidades da microsporogênese da cultivar IACSP93-3046 é elevado, sendo essas decorrentes da assincronia na divisão celular entre as espécies genitoras. As irregularidades permaneceram até as fases finais da meiose, resultando na sua perda de cromossomos e aneuploidias.

O uso da hibridação *in situ* fluorescente permitiu a identificação do pareamento cromossômico em IACSP93-3046, IACSP95-3018 e Caiana Fita, havendo a predominância de bivalentes.



## 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.

ARCENEUX, G. Cultivated sugarcane 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. **Chromosome 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.

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: <<http://doi.org/10.1007/BF02174028>>. 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/faostat-gateway/go/to/browse/rankings/commodities\\_by\\_regions/E](http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/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* x *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.org/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.org/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-açúcar 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: 15ª 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.

MARIN, F.R.; MARTHA JUNIOR, G.B.; CASSMAN, K.G.; GRASSINI, P. Prospects for increasing sugarcane and bioethanol production on existing crop area in Brazil. **Bioscience**, Washington, v. 66, n. 4, p. 307-316, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1093/biosci/biw009>>. Acesso em: 13 maio 2016.  
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.org/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: <<http://doi.org/10.1508/cytologia.37.565>>. 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: <<http://doi.org/10.1007/s00438-010-0546-3>>. 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. F<sub>2</sub> and BC<sub>1</sub> 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**. 3<sup>rd</sup> 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**. 3<sup>rd</sup> 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. Sugarcane. In: \_\_\_\_\_. **Evolution of crop plants**. London: Longman, 1979. p. 104-108.

SINGH, R.J. **Plant cytogenetics**. 2<sup>nd</sup> 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. Disponível 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.; JUNGSMANN, 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.