

DAVID CARLOS FERREIRA BAFFA

**HERDABILIDADE E CORRELAÇÕES GENOTÍPICAS DE CARACTERES
AGRONÔMICOS, CONSTITUINTES DA PAREDE CELULAR E
SACARIFICAÇÃO EM CANA-DE-AÇÚCAR**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2010

DAVID CARLOS FERREIRA BAFFA

**HERDABILIDADE E CORRELAÇÕES GENOTÍPICAS DE CARACTERES
AGRONÔMICOS, CONSTITUINTES DA PAREDE CELULAR E
SACARIFICAÇÃO EM CANA-DE-AÇÚCAR**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 22 de julho 2010.

**Prof. Marcelo Ehlers Loureiro
(Coorientador)**

**Prof. Luiz Alexandre Peternelli
(Coorientador)**

Dr. Valdir Diola

Dr. Francis Júlio Fagundes Lopes

**Prof. Márcio Henrique Pereira Barbosa
(Orientador)**

A Deus,
A toda minha família, em especial
Minha mãe(*in memoriam*), Maria do Carmo Ferreira Baffa
ao meu pai, José Carlos Baffa.
aos meus irmãos Juninho e Danielle.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, que me guiou nesse caminho para que pudesse descobrir que quando quero, sou capaz. Também me encheu de força e fez com que todos ao meu redor dissessem as palavras certas, nas horas exatas.

Agradeço a minha família: meu pai, minha mãe e meus irmãos que estiveram presentes em minha vida com carinho e dedicação. Em especial, a você minha mãe, por ter me ensinado a ser forte e perseverante nos momentos difíceis. Estou aqui hoje é porque devo tudo isso a você, mãe e a você meu pai.

À toda minha família: tios, tias, avós e primos que contribuíram muito para mais essa etapa.

À Germanna pela paciência, amizade e colaboração e apoio no decorrer desses anos.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Biologia Vegetal, pela oportunidade de realizar o mestrado.

Ao professor Márcio Henrique Pereira Barbosa, pela orientação, paciência, dedicação, confiança, carinho e amizade.

Aos professores Luiz Alexandre Peternelli e Marcelo Ehlers Loureiro pelos conselhos e ajudas durante o desenvolvimento do trabalho.

Aos amigos Dr. Francis Júlio Fagundes Lopes e o Pesquisador Dr. Felipe Lopes da Silva, pelas críticas e valiosas sugestões apresentadas, pelo carinho, confiança e apoio.

Aos funcionários do Departamento de Biologia Vegetal, Antônio Cordeiro, Carlos Raimundo, Geraldo, José Antônio, Oswaldo e Reginaldo, pela ajuda no laboratório.

A todos os estudantes do Laboratório de Biologia Molecular em especial ao amigo Dr. Valdir Diola, pelo apoio e confiança no meu trabalho.

A todos os funcionários do Centro de Pesquisa e Melhoramento da Cana-de-Açúcar-CECA, pela enorme ajuda nos experimentos em campo.

Aos amigos do Programa de Melhoramento de Cana-de-Açúcar em especial Gustavo da Silveira, pela força ao trabalho e compreensão.

A usina Jatiboca pelo apoio por meio de seu laboratório para realização das análises tecnológicas.

Ao CNPq pelo apoio financeiro para desenvolvimento deste projeto.

Agradeço a todos que, de uma forma ou de outra, contribuíram para a realização de mais essa etapa.

BIOGRAFIA

David Carlos Ferreira Baffa, filho de José Carlos Baffa e Maria do Carmo Ferreira Baffa, nasceu em Viçosa, Minas Gerais, em 31 de Janeiro de 1983.

Em janeiro de 2008, graduou-se em Agronomia, pela Universidade Federal de Viçosa (UFV), Minas Gerais.

Em junho de 2008, concluiu curso de Pós-Graduação *Lato Sensu* em Gestão e Tecnologia Sucroalcooleira, dentro do projeto Universidade da Cana na Faculdade Doutor Francisco Maeda (FAFRAM) em parceria com FMC Química do Brasil Ltda.

Em agosto de 2008, iniciou o curso de Mestrado em Genética e melhoramento, na Universidade Federal de Viçosa, concluindo os requisitos necessários para a obtenção a título *Magister Scientiae*, no dia 22 de julho de 2010.

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Objetivos	3
1.2. Objetivos específicos	3
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1. A cana-de-açúcar	4
2.2. Importância econômica	6
2.3. Etanol de segunda geração	8
2.4. Lignina	10
2.4.1. Biossíntese da lignina	12
2.5. Celulose e hemicelulose	15
2.6. Programa de melhoramento desenvolvido pela RIDESA	19
2.6.1. Cruzamentos	19
2.6.2. Seleção	19
3. MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1. Análises dos caracteres agronômicos	23
3.1.1. Tonelada de cana por hectare (TCH)	23
3.1.2. Diâmetro do colmo (DC)	24
3.1.3. Comprimento dos colmos (AC)	24
3.1.4. Número de entrenós por colmo (NE)	24
3.2. Análises tecnológicas da cana-de-açúcar	24
3.2.1. Determinação do brix no caldo extraído (BRIX %)	24
3.2.2. Determinação da fibra na cana-de-açúcar (FB %)	24

3.2.3. Determinação da pol no caldo extraído (POL %)	25
3.2.4. Determinação da pol na cana-de-açúcar (PCC %)	25
3.2.5. Determinação da pureza no caldo (Pureza %)	25
3.2.6. Determinação da matéria seca (MS %)	26
3.3. Análises da composição da parede celular	26
3.3.1. Lignina (LIG)	26
3.3.2. Celulose e hemicelulose (CEL e HEM)	27
3.4. Conversão de celulose e hemicelulose em glicose (GLIC)	27
3.4.1. Pré Tratamento do bagaço	27
3.4.2. Ensaio enzimático e preparo da amostra para cromatografia líquida	28
3.4.3. Identificação e Quantificação de Glicose por CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)	28
3.5. Análises estatísticas	28
3.5.1. Análise via modelos mistos	28
3.5.1.1. Modelo 70	29
3.5.1.2. Modelo 20	30
3.5.2. Análise de trilha	31
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
4.1. Estimativas dos Parâmetros genéticos	33
4.2. Predição dos valores genotípicos	35
4.3. Análise de trilha	37
5. CONCLUSÕES	48
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49

RESUMO

BAFFA, David Carlos Ferreira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2010.

Herdabilidade e correlações genotípicas de caracteres agrônômicos, constituintes da parede celular e sacarificação em cana-de-açúcar. Orientador: Márcio Henrique Pereira Barbosa. Coorientadores: Marcelo Ehlers Loureiro e Luiz Alexandre Peternelli

Um modelo de matriz energética mundial, idealmente baseado em fontes mais limpas e renováveis de energia em relação ao petróleo, se justifica pela crescente preocupação com a questão do aquecimento global. Além disso, pesquisas em biocombustíveis como fontes alternativas de energia são essenciais para garantir a atual posição de autonomia energética brasileira, além do interesse pela produção de excedentes para garantir a exportação e geração de divisas. Celulose é a biomassa renovável mais abundante na face da terra e por isso, uma boa alternativa energética em relação ao petróleo. Cana de açúcar apresenta na sua massa 2/3 de sua massa em material ligno-celulósico, um recurso energético abundante não utilizado eficientemente por meio das tecnologias atuais, representando portanto, um enorme potencial para a produção de etanol ligno-celulósico. A celulose pode ser hidrolisada em resíduos de glicose tanto por tratamento enzimático ou a base de ácidos. Há inconvenientes associados à hidrólise ácida e/ou enzimática do ponto de vista técnico e que precisam ser superados. No caso da hidrólise enzimática, a reação ocorre em meio não agressivo, porém, requer um longo tempo de espera (60 a 72 horas) e a componente lignina apresenta-se como um dos principais barreiras para o acesso da enzima a celulose. Portanto, o presente trabalho teve como objetivo obter avanços nas pesquisas em etanol celulósico a partir do bagaço e, potencialmente, outros resíduos provenientes do processamento da cana-de-açúcar, por meio da seleção de clones que apresentem fibra com elevado potencial de bioconvertibilidade. O experimento foi composto por 286 clones e 2 testemunhas (RB867515 e SP80-1842) em 25 blocos. Tais clones foram selecionados de 13 famílias de meios-irmãos e constituíram clones de primeira geração de propagação vegetativa. Para isso efetuou correlações entre características agrônômicas e bioquímicas desejáveis, avaliando a relação causa e efeito sobre o fibras e lignina dos colmos. Também estimou-se a possibilidade de definir os caracteres que deverem ser empregados para conduzir um programa de seleção recorrente em cana-de-açúcar visando à produção de álcool celulósico. Dos clones foram selecionados os 10 que apresentaram maior teor de lignina e os 10 que apresentaram menor teor de lignina no bagaço de cana. Os 20 clones foram avaliados quanto a possibilidade de se obter um

maior teor de glicose após o processo de hidrólise enzimática para produção de álcool celulósico. Foi possível observar que quanto maior o teor de lignina no bagaço menor o teor de glicose produzida ao final do processo de hidrólise. Também foi observado que o caráter hemicelulose teve maior correlação com a sacarificação. A hemicelulose funciona como um fator positivo na produção de açúcares fermentáveis para a fermentação, pois abre a estrutura da celulose permitindo acesso enzimático e pela sua quebra fornece moléculas de glicose para a fermentação. Portanto os clones selecionados apresentam potencial para aplicação no melhoramento genético da cana de açúcar, mesmo que ainda sejam necessários estudos complementares fenotípicos e de análise expressão gênica, quantificação enzimática e síntese de metabólicos, correlacionando-os com a síntese de lignina.

ABSTRACT

BAFFA, David Carlos Ferreira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2010.
Heritability and genotypic correlations of agronomic traits, cell wall constituents and saccharification in cane sugar. Advisor: Márcio Henrique Pereira Barbosa. Co-advisors: Marcelo Ehlers Loureiro and Luiz Alexandre Peternelli.

A model of an international energy matrix, ideally based on renewable and cleaner energy regarded to petrol, is justified because of the increasing awareness on the global warming issue. Moreover, researches on biofuel, as an alternative source of energy, are essential to guarantee the current ranking of the Brazilian energy autonomy, in addition to the interest in production of surplus so to guarantee exportation and generation of foreign exchange. Cellulose is the most abundant renewable biomass in the planet, therefore a good energetic alternative to petrol. Sugarcane has 2/3 of its mass in lignocellulosic material, an abundant energetic resource which is not efficiently used by the current technologies, therefore, representing an enormous potential for the production of lignocellulosic ethanol. Cellulose can be hydrolyzed in glucose residuals by enzymatic treatment as well as base of acids. Technically, there are some barriers associated to acid and /or enzymatic hydrolysis which need to be overcome. Considering enzymatic hydrolyses, the reaction takes place in a non-aggressive medium, however it takes a long waiting time (from 60 to 72 hours) to occur and the lignin compound is one of the main obstacles for the enzyme access to the cellulose. Thus, the present work aimed at obtaining progress for researches on cellulosic ethanol from the bagasse and, potentially, from other sugarcane by-products through selection of clones that shows high potential bioconvertibility fibers. The experiment was made up of 286 clones and 2 witnesses (RB867515 and SP80-1842) in 25 blocks. They were selected from 13 families of half-siblings and they were vegetative propagation first generation clones. Accordingly, it was carried out correlations among desirable biochemical and agronomical traits, evaluating the cause and effect relationship on fibers and lignin of the stem. It was also estimated the possibility on defining characters which have to be used to carry out a recurrent selection program on sugarcane aiming at alcohol production. It was selected 10 clones with highest lignin content and 10 clones with the lowest lignin content in the bagasse. Those 20 clones were evaluated for the possibility in obtaining a higher glucose content after enzymatic hydrolysis process for cellulosic alcohol production. It could be observed that the higher the content of lignin in the bagasse, the lower the content of glucose produced at the end of hydrolyses

process. It was also observed that hemicellulose is more efficient on the conversion than saccharification. Hemicellulose functions as a positive factor on fermentable sugar production for fermentation, because it breaks down cellulose structure allowing access of the enzymes and because of its rupture it supplies glucose molecules for fermentation. Therefore, selected clones show a high potential use on sugar cane genetic breeding, even though it is still needed phenotypic and gene expression analysis studies, enzymatic quantification and syntheses of metabolic, correlating them to syntheses of lignin.

1. INTRODUÇÃO

Biocombustíveis é atualmente um dos assuntos de grande repercussão internacional em função de fatores geopolíticos e estratégicos. Um modelo de matriz energética mundial, idealmente baseado em fontes mais limpas e renováveis de energia em relação ao petróleo, se justifica pela crescente preocupação com a questão do aquecimento global. Além disso, pesquisas em biocombustíveis como fontes alternativas de energia são essenciais para garantir a atual posição de autonomia energética brasileira, além do interesse pela produção de excedentes para garantir a exportação e geração de divisas. (MASIEIRO e LOPES, 2008)

Celulose é a biomassa renovável mais abundante na face da terra e por isso, uma boa alternativa energética em relação ao petróleo. A cana-de-açúcar apresenta 2/3 de sua massa em material lignocelulósico. Este é um recurso energético abundante e não utilizado eficientemente por meio das tecnologias atuais, representando portanto, um enorme potencial para a produção de etanol lignocelulósico.

A produtividade de etanol no Brasil pode ser incrementada pelo uso do bagaço da cana-de-açúcar. Atualmente, 50% do bagaço (que representa de 10 a 16% da planta) gerado na usina é consumido para produção de energia por meio da co-geração de calor, tornando a usina auto-sustentável energeticamente. Quimicamente o bagaço é muito interessante para a produção de bioetanol uma vez que seu conteúdo é de 50% em α -celulose, 25% em pentosanas, aproximadamente 25% de lignina e apenas 2,4% em cinzas (PANDEY *et al.*, 2008). O restante pode servir como matéria-prima na produção de etanol por meio da hidrólise ácida e/ou enzimática.

A celulose pode ser hidrolisada em resíduos de glicose tanto por ação de enzimas quanto por tratamento com ácidos. Há inconvenientes associados à hidrólise ácida e/ou enzimática do ponto de vista técnico e que precisam ser superados. No caso da hidrólise ácida, o meio é muito agressivo e os açúcares que se formam primeiro

acabam sendo degradados antes do fim da reação, que pode levar de quatro a seis horas. Além disso, a hidrólise química libera compostos que inibem a fermentação (OLIVA *et al.*, 2006). No caso da hidrólise enzimática, o processo ocorre em meio não agressivo, porém, requer um longo tempo de reação (60 a 72 horas) (RBB, 2007). Além disso, a enzima constitui um fator financeiro impactante neste tipo de hidrólise.

Além dos inconvenientes do ponto de vista técnico, alguns constituintes da fibra, como a lignina, representa um dos principais entraves a processos industriais como a polpação da madeira, durante o processo de fabricação de papel e a produção de etanol celulósico a partir de biomassa vegetal. As características do substrato que aliadas à maior eficiência de taxa de hidrólise da celulose incluem: a acessibilidade, o grau de cristalinização, o grau de polimerização e a distribuição da lignina.

Na produção de etanol celulósico, a lignina dificulta o acesso de enzimas hidrolíticas aos carboidratos fermentáveis, acarretando perdas no processo e aumentando o custo de produção, uma vez que a enzima é consumida no decorrer do processo. Há estudos mostrando que o ácido fórmico e as unidades precursoras de lignina inibem as enzimas responsáveis pela hidrólise da celulose, as celulasas (PANAGIOTOU e OLSSON, 2007; CANTARELLA *et al.*, 2004). Além disso, a hidrofobicidade da lignina pode promover a adsorção das celulasas (JORGENSEN e OLSSON, 2006; LU *et al.*, 2002; BERLIN *et al.*, 2005).

Em virtude da importância biológica da lignina para a planta e sua representatividade nas fibras de interesse comercial, muito se conhece a respeito da sua rota biossintética e como se dá a sua incorporação à fibra (BOERJAN *et al.*, 2003). Sua composição varia entre os diversos grupos de plantas: em gimnospermas predomina o tipo G (guaiacila), em angiospermas, G-S (guaiacila-siringila) e em gramíneas, destaca-se a lignina tipo G-S-H (guaiacila-siringila-p-hidroxifenila) (HIGUCHI, 2006). Em gramíneas, a lignina incorpora níveis similares de G e S e possuem mais resíduos H que dicotiledôneas (BAUCHER *et al.*, 2003). Os monolignóis polimerizam-se para constituir a lignina por meio de ligações do tipo C-C ou éter. No processo Kraft, são as ligações éter não condensadas (β -O-4-) os alvos do processo de delignificação enquanto que as ligações C-C (β - β , β -1, β -5 e 5-5) são mais resistentes à degradação química.

Essa idéia pode ser extrapolada para produtos, como o bagaço, constituídos de fibras lignificadas. Estudos mostram de forma inequívoca, que a modificação de alguns passos chaves do metabolismo de lignina por meio de engenharia genética pode resultar em plantas melhoradas para o processo de polpação ou sacarificação (BAUCHER *et al.*, 1998; LAPIERRE *et al.*, 2000; BAUCHER *et al.*, 2003). A literatura também relata

estudos onde se obtiveram linhagens transgênicas da *Arabidopsis thaliana* alteradas para a expressão de genes chaves que codificam para enzimas da rota de síntese da lignina (ANTEROLA e LEWIS, 2002; SIBOUT *et al.*, 2002) e em alguns deles, pôde-se verificar um reflexo na composição de polissacarídeos de parede (TAMAGNONE *et al.*, 1998; LAPIERRE *et al.*, 1999). Em plantas de álamo foi possível produzir árvores onde a extração da lignina foi mais fácil, facilitando o processo de produção de papel. Nestes, o gene CAD foi silenciado resultando em plantas com menor teor de lignina (BAUCHER *et al.*, 1996). Estes resultados ilustram o impacto da lignina contida na biomassa vegetal sobre a eficiência de hidrólise enzimática e, conseqüentemente no rendimento da produção de álcool lignocelulósico. Entretanto, particularmente para a cana-de-açúcar, estes efeitos ainda não foram caracterizados.

1.1. Objetivo geral

Avançar nas pesquisas em etanol celulósico a partir do bagaço e, potencialmente, outros resíduos provenientes do processamento da cana-de-açúcar, por meio da seleção de clones que apresentem fibra com elevado potencial de bioconversibilidade.

1.2. Objetivos específicos

- Caracterizar, agronomicamente, clones quanto aos principais caracteres de produtividade e características químicas das fibras dos colmos.
- Estimar correlações e avaliar a relação causa e efeito entre os caracteres agrônômicos e as características químicas das fibras dos colmos
- Definir os caracteres que deveriam ser empregados para conduzir um programa de seleção recorrente em cana-de-açúcar visando à produção de álcool celulósico.
- Selecionar clones com diferentes características de fibra para estudos posteriores acerca da produção de álcool celulósico.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. A cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar (*Saccharum spp*) é uma monocotiledônea, pertencente à família Gramineae (Poaceae), gênero *Saccharum*. Todas as cultivares de cana-de-açúcar – seja para produção de açúcar, álcool aguardente ou forrageira – são híbridos, provenientes do cruzamento de diferentes espécies de cana (ANDRADE, 2002).

Esses híbridos clonais, geralmente de 6^a a 10^a geração, são constituídos por contribuições das espécies *S. officinarum*, *S. barberi*, *S. sinensi*, *S. spontaneum* e *S. robustum* (ROACH E DANIELS,1987; MATSUOKA *et al.*, 2005). Geralmente, procura-se aliar a rusticidade de espécies como *S. spontaneum*, às boas qualidades das cultivares nobres de *S. officinarum*.

A qualidade da cana-de-açúcar como matéria-prima industrial pode ser definida como uma série de características intrínsecas da própria planta, alterada pelo manejo agrícola e industrial, que definem seu potencial para produção de açúcar e álcool.

Cana é um termo genericamente aceito para designar os “colmos industrializáveis da cana-de-açúcar”, os quais são cortados na base rente ao solo, despontados no último entrenó maduro, e livres de impurezas, folhas e bainhas.

Os colmos da cana-de-açúcar possuem composição extremamente variável em função de diversos fatores, como idade cronológica e fisiológica da cultura, época de amostragem, variedade, estágio de corte, sanidade das plantas, condições climáticas durante o desenvolvimento e maturação, adubação e fertirrigação, tipo de solo, etc. A composição é variável também no sentido longitudinal e transversal do colmo. Sob o aspecto tecnológico, os colmos são constituídos de caldo e sólidos insolúveis em água: Cana=sólidos insolúveis + caldo. Os sólidos insolúveis são representados pela fibra da cana. O caldo contém a água (umidade da cana) e os sólidos solúveis totais (açúcares e

não açúcares) (Figura 1). (Caldo = sólidos solúveis totais + água; sólidos solúveis totais = Brix) (COPERSUCAR, 2005)

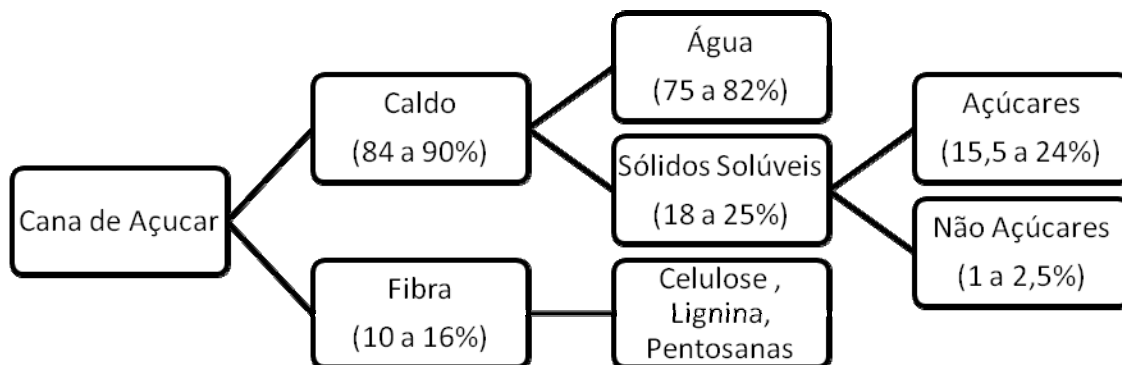


Figura 01: Composição tecnológica dos componentes da cana de açúcar

Assim, a soma da fibra (%), brix (%) e umidade (%) da cana deverá resultar sempre 100 %. Um exemplo prático é a composição da variedade RB 72-454 (Figura 02).

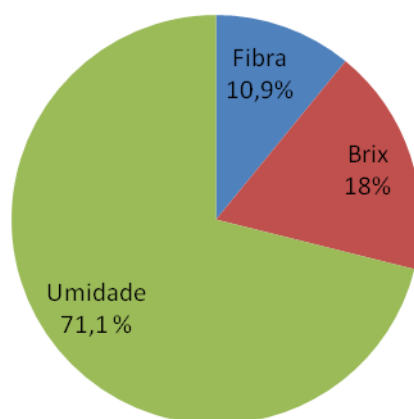


Figura 02: Composição tecnológica da variedade RB72-454

2.2. Importância econômica

Na década de 1970, o governo brasileiro criou maior programa de produção e uso de biocombustíveis já estabelecido no mundo: o “Programa Nacional do Álcool – Proálcool”. Este programa estimulava os empresários do setor a implantar destilarias autônomas e a melhorar e/ou criar destilarias anexas às usinas por meio de empréstimos subsidiados e garantia de venda, com o objetivo de diminuir a dependência brasileira de petróleo. Contudo, em 1985, a baixa dos preços internacionais do petróleo inviabilizou o Proálcool, que seria viável com o preço do barril de petróleo acima de US\$ 40,00. O Proálcool entrou em desaceleração e posteriormente em crise, ocasionando uma drástica redução dos investimentos públicos no programa e uma instabilidade entre oferta e demanda de álcool combustível (SANTOS e OMETTO, 2008; PAULILLO *et al.*, 2007; FILHO, 2003)

Atualmente, o Brasil passou a ser o destaque no cenário internacional devido à preocupação mundial com a segurança energética, ambiental e social, levando os produtores de cana, açúcar e álcool a expandir em cada vez mais sua produção. Devido a esta expansão canavieira, atualmente o país é o maior produtor mundial, com uma área plantada de aproximadamente 8 milhões de hectares e com uma expectativa de safra de 665 milhões de toneladas cana, superior a 9,9% à safra anterior 2009/10 (Tabela 01). Nessa safra aproximadamente 362 (54%) milhões de toneladas são destinadas à produção de álcool, devendo gerar um volume total de 28.500 milhões de litros de álcool, sendo que deste total, 8.359,9 milhões de litros são de álcool anidro e 20.140,1 milhões de litros serão de álcool hidratado, segundo levantamento da Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2010) (Tabela 02). O setor sucroalcooleiro é responsável por movimentar mais de 41 milhões de reais por ano, o que corresponde a aproximadamente 3,65% do PIB nacional. O setor gera 4 milhões de empregos diretos e indiretos, existindo ainda cerca de 72 mil agricultores que fornecem matéria-prima para as usinas e destilarias (UDOP, 2006).

Tabela 01: Comparativo de área e produção de cana-de-açúcar

Região	Área (mil ha)			Produção (mil ton)		
	Safra 2009/10	Safra 2010/11	Var. %	Safra 2009/10	Safra 2010/11	Var. %
Norte	17,2	29,9	73,80	991,6	2.671,7	169,40
Nordeste	1.082,6	1.128,9	4,30	60.677,2	65.452,0	7,90
Centro-Oeste	940,3	1.160,1	23,40	77.435,9	98.132,3	26,70
Sudeste	4.832,6	5.163,5	6,80	419.857,7	447.445,1	6,60
Sul	537,0	609,0	13,40	45.551,3	50.632,3	11,20
Brasil	7.409,6	8.091,5	9,20	604.513,6	664.333,4	9,90

Fonte: CONAB

Tabela 02: Estimativa de produção de álcool, safra 2010/11

Região	Álcool Total (1.000 l)	Álcool Anidro (1.000 l)	Álcool Hidratado (1.000 l)
Norte	182.053,6	9.034,6	173.018,9
Nordeste	2.025.045,1	903.211,9	1.121.833,2
Centro-Oeste	5.334.759,5	1.149.101,8	4.185.657,7
Sudeste	19.078.304,1	5.876.396,4	13.201.907,7
Sul	1.879.824,6	422.184,3	1.457.640,2
Brasil	28.499.986,9	8.359.929,2	20.140.057,7

Fonte: CONAB

A cada ano cresce, significativamente, o número de unidades produtoras de açúcar e álcool. De acordo com o MAPA, (2009), existem no Brasil 420 unidades produtoras, distribuídas em unidades de álcool, açúcar e mistas (Figura 03).

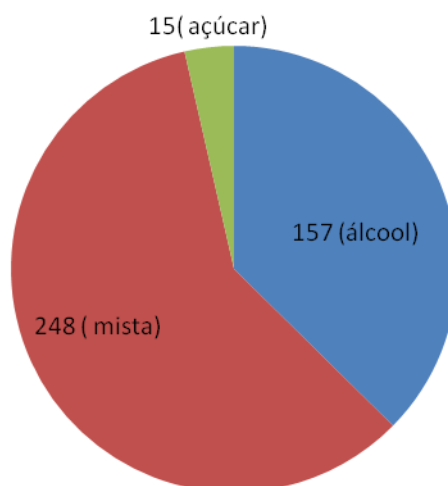


Figura 03: Número das unidades produtoras de álcool e açúcar no Brasil

2.3. Etanol de segunda geração

Na produção de etanol de segunda geração, a matéria-prima, que consiste na biomassa contendo celulose e outros açúcares fermentescíveis, é hidrolisada por um processo enzimático.

De forma simplificada, o processo de transformação de biomassa em combustível consiste de três etapas:

- No pré-tratamento, o bagaço – de cana ou de qualquer outra matéria-prima – é preparado para que a maior quantidade possível de biomassa possa ser aproveitada.
- A segunda fase, a hidrólise enzimática, consiste na hidrólise dos açúcares por enzimas de micro-organismos.
- A terceira etapa é a fermentação dos açúcares liberados durante a hidrólise enzimática.

Em teoria, para que uma usina de álcool possa produzir etanol a partir de celulose no Brasil, basta que seja instalada junto a ela uma estrutura capaz de executar a operação de hidrólise. Os açúcares provenientes da quebra da celulose seriam misturados ao caldo da cana e, em seguida, passariam pelos processos de fermentação e destilação. Na prática, soma-se ao investimento em infra-estrutura o custo da tecnologia, que ainda é muito alto. O segredo para reduzir custos e viabilizar economicamente a produção está na primeira e segunda fase desse processo (NEF, 2009).

O Brasil tem o domínio da tecnologia de álcool a partir da cana-de-açúcar, enquanto os EUA possuem a tecnologia para produção de etanol a partir de milho. No Brasil, a transformação da celulose da cana em etanol deverá ocorrer a partir de 2012 (NEF, 2009).

Estima-se que em 2020, o Brasil estará produzindo entre 10 e 17,3 bilhões de litros de etanol celulósico. Com acesso a mercados como EUA e Europa, poderá faturar cerca de US\$ 7,8 bilhões por ano com exportações. New Energy Finance (2009).

Uma grande vantagem acerca do bagaço de cana como matéria-prima da segunda geração é a sua sustentabilidade dos pontos de vista social, econômico e ambiental.

Como o bagaço da cana já está dentro da usina, não há custos fixos. E os custos variáveis podem ser diluídos com ganho de escala.

Em comparação com o etanol de amido de milho produzido nos EUA, o etanol a partir dos resíduos lignocelulósicos de cana apresenta vantagens evidentes. Ainda na primeira geração, o etanol da cana já apresenta vantagem. Enquanto o milho exige quebra enzimática do amido em glicose, na cana a liberação da sacarose é feita fisicamente, pela moagem. Além disso, nos EUA há uma complicada e cara logística de coleta, transporte e armazenagem, para a qual a indústria local ainda não está preparada.

Os custos podem ser reduzidos ainda mais na segunda geração. Unindo tecnologias de primeira e segunda geração, é possível obter até 50% mais etanol por hectare de cana, garantem as empresas e institutos de pesquisa que participam da corrida tecnológica. Hoje, um hectare de cana rende em média 8.200 litros de etanol. Com o processamento dos resíduos o rendimento pode saltar para quase 130.000 litros (RBB, 2007).

O ganho de produtividade também dá ao Brasil mais dois selos: de sustentabilidade social e ambiental. Social porque, produzindo mais na mesma área, a cana não rouba a área de produção alimentos. Ambiental porque não aumenta as emissões de gases do efeito estufa, pois não é necessário desmatar florestas para ampliar a produção. São condições importantes para a abertura de novos mercados, considerando que o Brasil tem sido fortemente cobrado pela comunidade internacional. Em 2008, o etanol brasileiro de cana chegou a ser apontado como um dos maiores vilões do aquecimento global e da inflação dos alimentos. Hoje, é visto como parte da solução.

2.4. Lignina

A palavra lignina vem do latim *lignum*, que significa madeira. Trata-se de um dos principais componentes dos tecidos vasculares de gimnospermas e angiospermas. Sabe-se que a lignina tem um importante papel no transporte de água, nutrientes e metabólitos, sendo responsável pela resistência mecânica de vegetais, além de proteger os tecidos contra o ataque de microorganismos. (FENGEL & WEGENER, 1984).

A lignina é uma substância amorfa, de natureza aromática e muito complexa, e faz parte da parede celular e da lamela média dos vegetais. Apesar de todos os estudos realizados até hoje sobre lignina, muitos pontos, relativos principalmente à sua estrutura, permanecem em dúvida. Isto decorre da grande diversidade da estrutura das ligninas quando se passa de uma espécie vegetal para outra ou, até mesmo, dentro da mesma espécie, quando são analisadas partes diferentes do vegetal. Pode-se observar em eucaliptos cultivados na Europa ou no Brasil diferenças na constituição de suas ligninas, devidas, principalmente, às diferentes condições de solo e de clima. A lignina é um polímero de constituição difícil de ser estabelecida, por causa não somente da complexidade de sua formação, baseada em unidades fenilpropanóides interligadas por diferentes tipos de ligações, como também porque sofre modificações estruturais durante seu isolamento das paredes celulares (MORAIS 1987, 1992).

Cabem aqui outras definições encontradas na literatura, além da definição puramente química. Lignina é um polímero derivado de unidades fenilpropanóides denominadas C6C3 ou, simplesmente, unidades C9, repetidas de forma irregular, que têm sua origem na polimerização desidrogenativa do álcool coniferílico (SALIBA *et al.*, 2001). A lignina deve ser definida claramente de acordo com o trabalho em questão, devido à grande diversidade de maneiras de tratamento para seu isolamento. LAPIERRE (1993) classificou a lignina em *core* e não *core*, com base em sua susceptibilidade relativa à hidrólise.

- Lignina não *core*: consiste de compostos fenólicos de baixo peso molecular, liberados da parede celular por hidrólise, que é representada por ácidos *p*-hidroxicinâmico éster-ligados.

- Lignina *core*: consiste de polímeros fenilpropanóides da parede celular, altamente condensados e muito resistentes à degradação. Eles são compostos de unidades *p*-hidroxifenila (H), guaiacila (G) e siringila (S), em proporções diferentes, de acordo com sua origem (Figura 04).

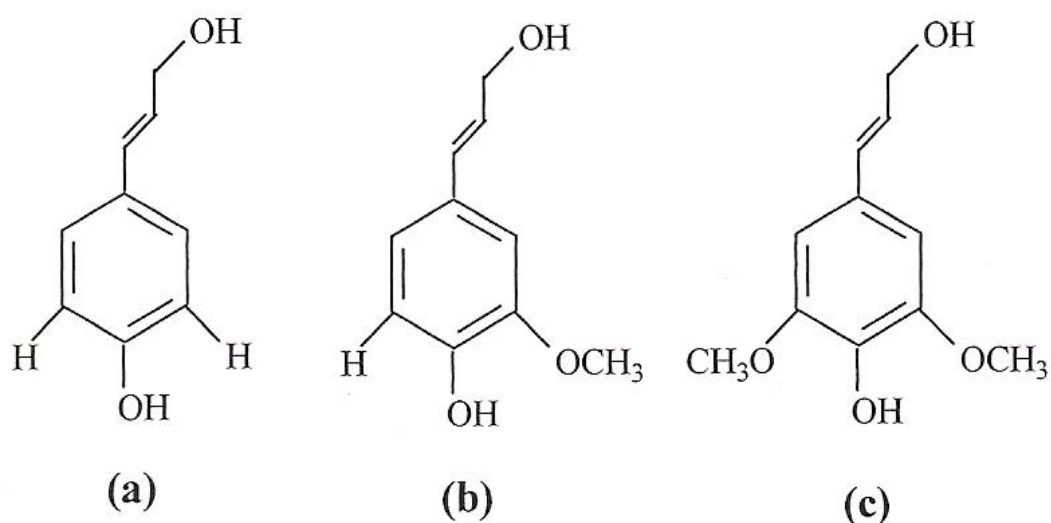


Figura 04: Estruturas químicas das unidades: p- hidroxifenila (a), guaiacila (b) e siringila (c) da lignina.

SARKANEM e LUDWIG (1971) observaram que a quantidade relativa da fração molar de aldeídos produzidos pela reação de oxidação com nitrobenzeno é um indicador da abundância relativa das unidades C9 (H, G e S). Assim, numa classificação inicial da lignina segundo a presença dessas unidades, tem-se que: lignina de madeiras duras, ou angiospermas, é formada principalmente de unidades G e S; lignina de madeiras moles, ou gimnospermas, é formada fundamentalmente de unidades G; lignina de gramíneas é do tipo G-S-H. Porém, existem ligninas de certas espécies de gimnospermas e de gramíneas que apresentam abundância de G e S (CHEN, 1991).

Lignina de plantas herbáceas é do tipo S-G, sendo mais parecida com a lignina de angiospermas que de gimnospermas (SARKANEN e LUDWIG, 1971). Portanto, em uma conceituação mais precisa, a lignina pode ser classificadas nos seguintes grupos: Tipo G; Tipo G-S; e Tipo H-G-S (CHEN, 1991; PILÓ-VELOSO *et al.*, 1993). Em estudos realizados por SALIBA *et al.* (1999a), pôde-se verificar que a lignina da folha do milho é do tipo H-G-S.

Em plantas herbáceas, a lignina não pode ser definida apenas como proveniente de derivados de ácidos fenólicos. Deve-se trabalhar com as definições *core* e não *core* para se descrever o material residual e os componentes ácidos hidroxicinâmicos liberados durante a hidrólise, respectivamente. Assim, essas definições, segundo RALPH e HELM (1993), são convenientes para investigações dentro do aspecto

nutricional das forragens, bem como para comparar a composição das plantas, pois esta terminologia discute aspectos moleculares da estrutura da lignina. Portanto, somente derivados dos ácidos hidroxicinâmicos que estão covalentemente ligados aos polímeros da parede celular, são liberados durante a hidrólise, constituindo a chamada lignina não *core*. Conseqüentemente, derivados de ácidos hidroxicinâmicos que compõem a lignina através de ligações inter-resistentes a hidrólise, pela definição, constituem as ligninas *core*.

2.4.1. Biossíntese da lignina

A lignina é um polifenol formado a partir da ligação de vários grupos fenilpropanóides (compostos fenólicos contendo um anel benzeno). Esses grupos são derivados de reações químicas a partir da fenilalanina, sintetizada na via do ácido xiquímico, através da adição de grupos hidroxilas. A via do ácido xiquímico é responsável também pela síntese da tirosina, a qual também pode dar origem a outros fenilpropanóides. No entanto, é a fenilalanina o principal substrato para a formação dos grupos fenilpropanóides constituintes da lignina. O início da síntese de grupos fenilprapanóides se dá com a remoção de uma molécula de amônia da fenilalanina para formação do ácido cinâmico. Este, com a adição de grupos hidroxilas, pode gerar os outros fenilpropanóides, como o ácido cumárico (Figura 05).

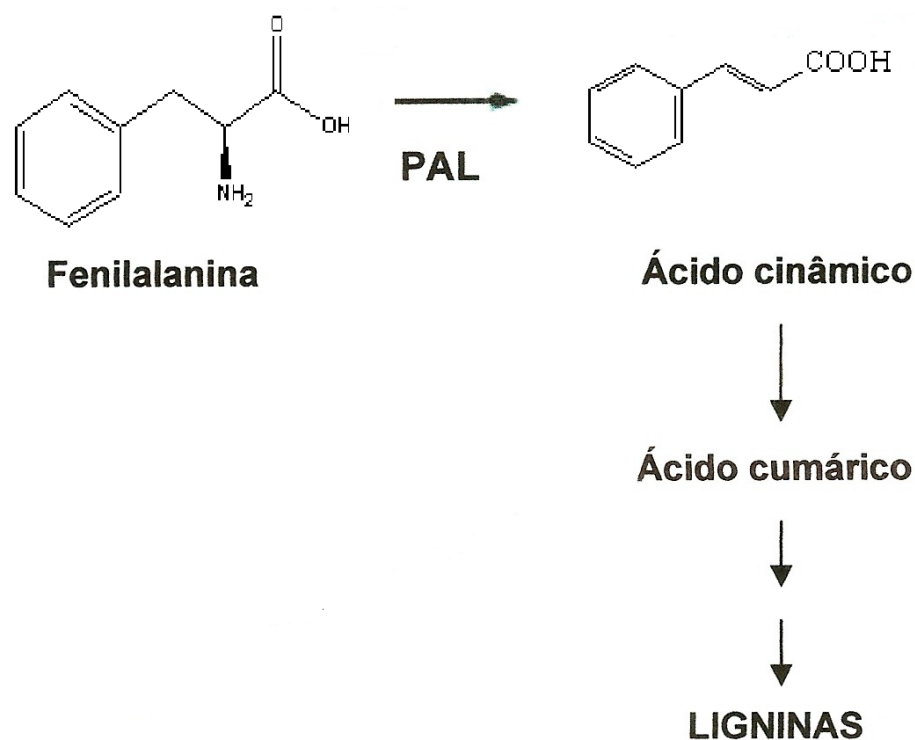


Figura 05: Reação enzimática da Fenilalanina amônia liase (PAL) e síntese de lignina.

O ácido cumárico sintetizado é responsável pela formação dos principais precursores da lignina, os álcoois fenilpropanóides cumaril, coniferil e sinapil precursores das ligninas hidroxifenila (H), guaiacila(G) e siringila (S), respectivamente. A síntese desses precursores é mediada por ação enzimática. Estes compostos fenólicos constituem os principais componentes da lignina podendo conferir diferentes propriedades a este polímero (Taiz & Zeiger, 1998). Esses compostos ao final da polimerização formam uma estrutura heterogênea onde as subunidades básicas são unidas por ligações carbono-carbono e ligação éter, conforme mostrado na Figura 06.

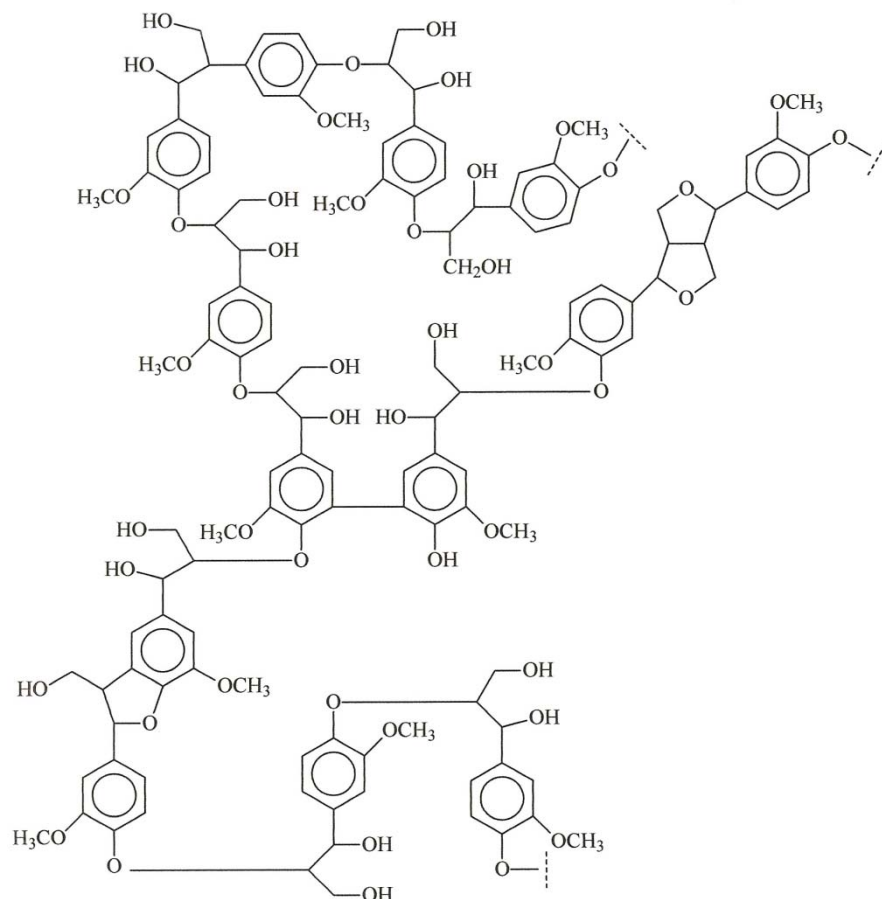


Figura 06: Estrutura química parcial da lignina (PÉREZ et al, 1993).

É importante destacar que a conversão da fenilalanina a ácido cinâmico é catalisada pela enzima fenilalanina amônia liase (*PAL*), sendo esta, provavelmente, a enzima mais estudada no metabolismo secundário das plantas (TAIZ e ZEIGER, 1998). A *PAL* está situada entre o metabolismo primário e secundário, constituindo assim um importante passo no controle do processo de formação de compostos fenólicos. Estudos com diferentes espécies de plantas tem mostrado que a atividade da *PAL* é aumentada por fatores ambientais, tais como baixos níveis de nutrientes, luz (através do seu efeito sobre fitocromos), e ataques fúngicos (Hahlbrock & Scheel, 1989). Tal fato vem em parte justificar a grande variabilidade da lignificação em resposta a nutrição das plantas e ao estresse (VAN SOEST, 1994).

A regulação da atividade da *PAL* se dá principalmente no início da sua transcrição e é ainda mais complexa pela existência de múltiplos genes codificadores da *PAL* em muitas espécies (TAIZ e ZEIGER, 1998). Este é um importante aspecto a ser levado em conta, principalmente quando o estudo do papel nutricional da lignina passa

pela manipulação genética, como tem acontecido ultimamente (Chapple e Carpita, 1998; Boudet, 1998).

A lignina é a principal fonte de compostos fenólicos nas plantas. A sua síntese imediata se dá com a formação de radicais livres a partir dos precursores fenilpropanóides pela ação de uma fenol oxidase. A formação desses radicais segue uma série de reações não enzimáticas para formar polifenóis ou polímeros de lignina. A falta de um molde na polimerização resulta numa série de ligações químicas aleatórias, as quais conferem à lignina um elevado grau de complexidade estrutural. Ligações fortes carbono – carbono e éter (C – C; C – O – C; respectivamente) na lignina a tornam resistente a hidrólise, tornando ainda mais difícil seu isolamento e análise estrutural (JUNG E FAHEY, 1983). O mesmo é ratificado por Van Soest (1994), destacando que os produtos da polimerização apresentam uma estrutura tridimensional condensada, a qual explica porque a lignina é tão refratária a hidrólise. Taiz e Zeiger (1998) afirmam que os radicais livres formados a partir das unidades fenilpropanóides precursoras são gerados por ação enzimática, corroborando a proposta de Jung e Fahey (1983).

A polimerização dos álcoois fenilpropanóides envolve a formação de radicais livres resultantes da reação com oxigênio ou peróxido. Peroxidases assim como luz ultra-violeta podem induzir a dimerização ou polimerização. A polimerização resulta em perda de identidade dos precursores. Sendo irreversível, a polimerização torna muito difícil a identificação dos componentes da estrutura (VAN SOEST, 1994).

2.5. Celulose e hemicelulose

A celulose é o mais abundante material orgânico existente na terra (HON e SHIRAIISHI, 2001). É um polímero linear de moléculas de celobiose que constitui aproximadamente 50% da massa seca do bagaço, apresentando em sua estrutura subunidades de β -D glicose unidas por ligações glicosídicas do tipo β (1,4), como mostrada na figura 07 (PÉREZ *et al.*, 2002). O conjunto de longas cadeias de celulose (fibrilas elementares) dá origem às chamadas macrofibrilas, que ajudam a compor a estrutura da parede celular.

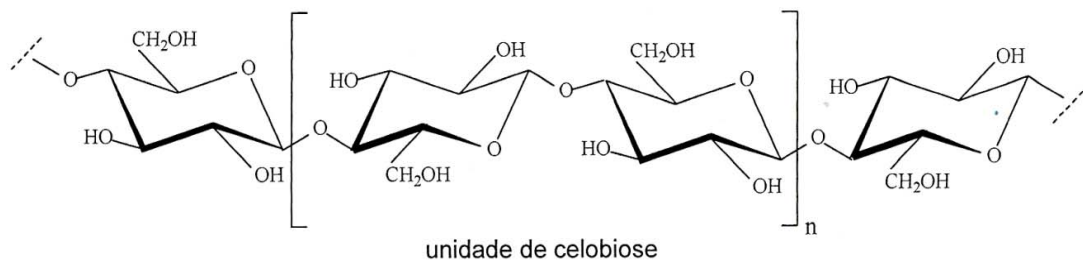


Figura 07: Estrutura química parcial da celulose.

O maquinário enzimático complexo que sintetiza as cadeias de celulose estende-se por toda a espessura da membrana plasmática, com uma porção posicionada para o citosol onde capta seu substrato (UDP-glicose) e uma voltada para exterior celular responsável pelo alongamento e cristalização da molécula, conforme figura 08 (SAXENA e BROWN, 2000).

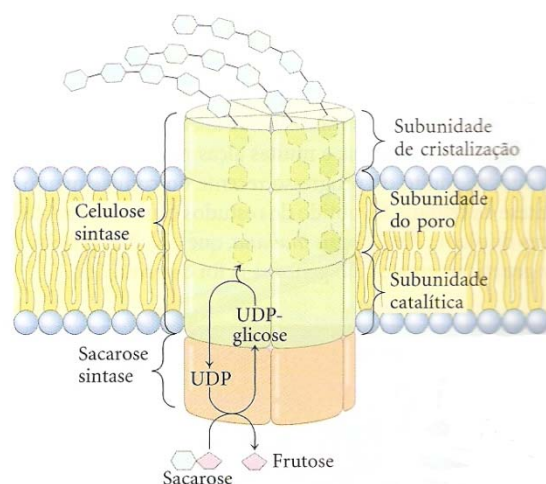


Figura 08: Um modelo plausível da estrutura da celulose sintase.

A via proposta por Saxena e Brow (2000), demonstrada na figura 09, começa com a transferência de um resíduo de glicose da UDP-glicose para um iniciador (Sitosterol) na porção interna da célula (etapa 1). Depois a cadeia é alongada pela transferência alguns resíduos de glicose do UDP-glicose até atingir um tamanho crítico (etapas 2 e 3). Em seguida o Sitosterol ao qual o oligossacarídeo está ligado se dobra de forma a passar para face externa da membrana (etapa 4). Uma enzima específica separa a cadeia de resíduos de glicose do Sitosterol e a liga a celulase sintase (etapa 5). Nesse momento o iniciador volta a conformação para o interior da membrana (etapa 7). Agora

a celulose sintase adiciona inúmeros resíduos de glicosil usando UDP-glicose como substrato.

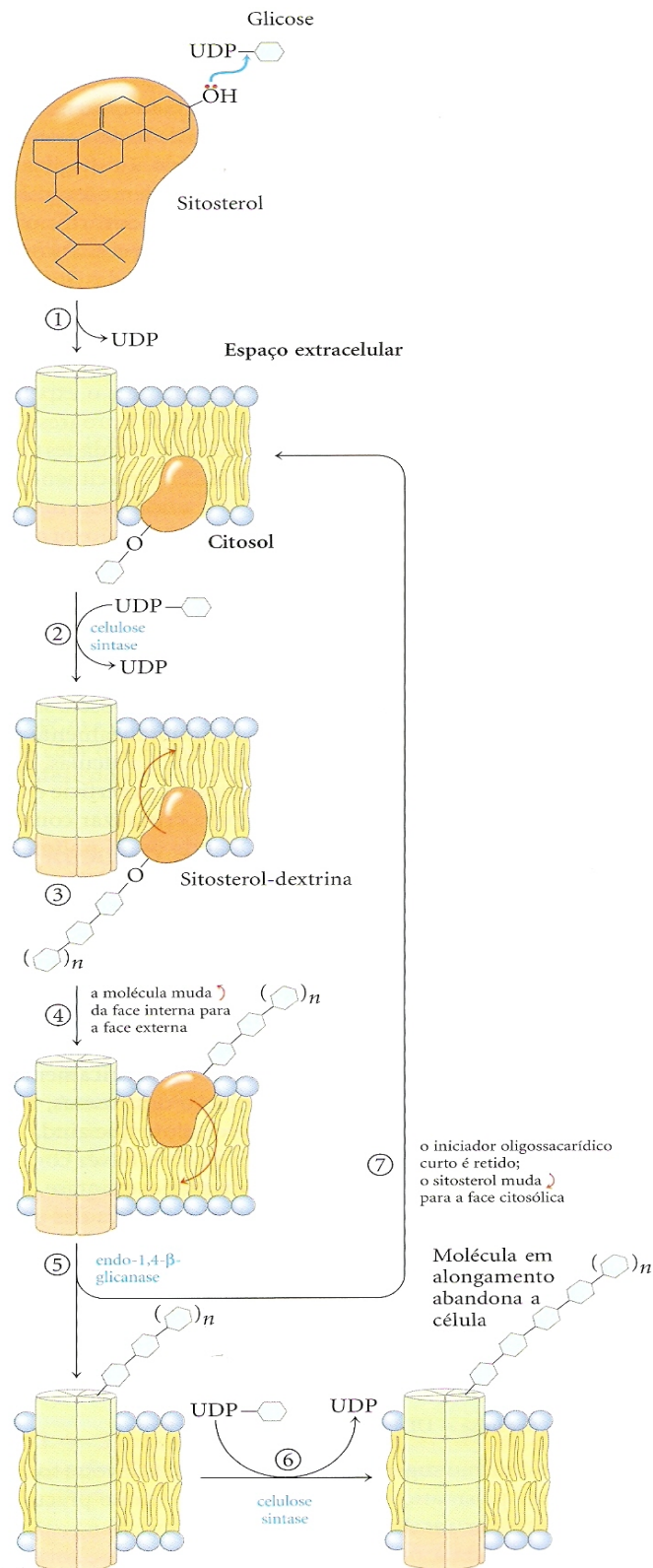


Figura 09: Mecanismo de biossíntese de celulose (SAXENA E BROWN, 2000)

Associada à celulose está a hemicelulose, que é uma macromolécula complexa e de estrutura bastante diversificada. Esse componente representa em torno de 25 a 30 % da massa seca, sendo formada por ligações glicosídicas entre diferentes monossacarídeos, tais como: β -D-xilose, β -D-manose, β -D-galactose, e α -L-arabinose, ácidos α -D-glicurônico, e β -D-galacturônico bem como grupamentos 4-O-metil (PÉREZ *et al.*, 2002; HON e SHIRAISHI, 2001).

As hemiceluloses de angiosperma e de gimnosperma diferem-se não apenas em teor, mas também em sua composição, sendo que na primeira o principal componente é uma glicuronoxilana (Figura 10 A). Já na segunda, a galactoglicomanana é a hemicelulose predominante (Figura 10 B).

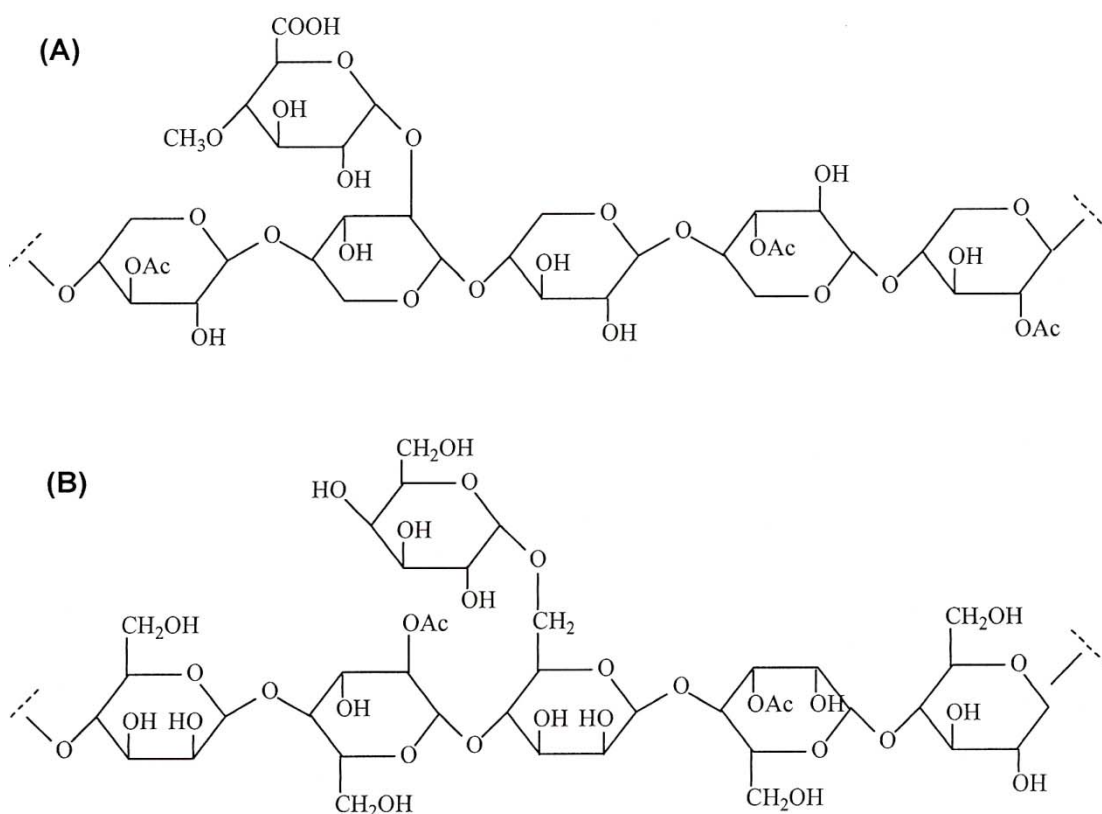


Figura 10: Estrutura química parcial das hemiceluloses: (A) O-acetil-4-O-metilglicuronoxilana de angiospermas; (B) O-acetil-galactoglicomanana de gimnosperma

2.6. Programa de melhoramento desenvolvido pela RIDESA

A Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroalcooleiro-RIDESA, a qual foi instituída após a extinção do PLANALSUCAR, não somente deu continuidade ao programa de desenvolvimento de novas cultivares realizado por este último programa, como também o ampliou para atender a crescente demanda do setor, inclusive com o desenvolvimento de cultivares precoces.

Segundo Barbosa *et al.* (2005), o programa de melhoramento da RIDESA tem como ponto forte a parceria com usinas e destilarias, as quais têm participado do desenvolvimento das cultivares desde as etapas iniciais do programa. Esse trabalho de parceria permite ao produtor e ao melhorista definir a melhor estratégia de manejo para as novas cultivares desenvolvidas.

Até o presente momento, 78 cultivares já foram liberadas pela RIDESA, sendo três delas, RB867515, RB928064 e RB937570, desenvolvidos pela Universidade Federal de Viçosa. As cultivares de sigla RB, anteriormente desenvolvidas pelo PLANALSUCAR, e atualmente pela RIDESA, estão sendo cultivadas em 58% da área plantada com cana-de-açúcar no país, chegando em algumas regiões, a representar até 70% da área (RIDESA, 2010).

As metodologias empregadas no programa de melhoramento da cana-de-açúcar da RIDESA são relatadas por Barbosa e Silveira (2000), Barbosa *et al.* (2005) e Matsuoka *et al.* (2005).

2.6.1. Cruzamentos

Os cruzamentos tem sido realizados na Estação de Floração e Cruzamento localizado na Serra do Ouro, em Murici, AL, sob a responsabilidade da Universidade Federal de Alagoas. Nesta Estação, de acordo com Barbosa *et al.* (2005) estão reunidos mais de 2000 genótipos, entre cultivares utilizadas no país, clones, outras espécies relacionadas ao gênero *Saccharum* e cultivares importadas das diferentes regiões canavieiras do mundo.

2.6.2. Seleção

Assim como no extinto PLANALSUCAR, o processo de seleção da RIDESA é subdividido em cinco fases, as quais se convencionaram denominar fases T1, T2, T3,

FM e FE, ou seja, primeira, segunda e terceira fase de seleção, fase de multiplicação e fase experimental, respectivamente.

- **Primeira fase de seleção (T1)**

A primeira fase de seleção é denominada T1, e é constituída por “seedlings” (plântulas) provenientes de cruzamentos pré-estabelecidos pelas universidades constituintes da RIDESA. Anualmente são produzidos pela RIDESA, cerca de 2.000.000 de plântulas para esta fase. Juntamente com as plântulas, são alocadas no campo parcelas de cultivares-padrão, as quais são essenciais para se obter estimativas prévias do Brix, além de servirem de referência na seleção dos genótipos para florescimento e chochamento.

No mês de julho do ano subsequente ao transplântio, em plena época seca e fria, é efetuado o corte em cana-planta. A seleção de genótipos a serem clonados tem sido realizada dos 10 aos 12 meses no estádio de cana soca. A seleção em cana soca é preferida por alguns programas de melhoramento,—uma vez que os genótipos são submetidos à seleção natural em época de elevado déficit hídrico para a característica capacidade de rebrota (Lascano e Mariotti, 1970). Adicionalmente, algumas universidades fazem a seleção em duas épocas, abril e junho, de forma a se buscar, naquela primeira época, genótipos que apresentem a importante característica de precocidade de maturação (Barbosa *et al.*, 2005).

Na fase T1 seleciona-se preferencialmente, plantas que apresentem: a) mais de seis colmos por touceira; b) colmos de idade fisiológica semelhante e de diâmetro médio; c) hábito de crescimento ereto; d) tolerância às principais doenças fúngicas de ocorrência natural na região; e) florescimento e chochamento ausentes; e f) Brix semelhante ou superior ao das cultivares-padrão (Barbosa e Silveira, 2000, Matsuoka *et al.*, 2005, Pedrozo *et al.*, 2008).

- **Segunda fase de seleção (T2)**

A segunda fase de seleção é constituída por clones, os quais são selecionados na cana soca da fase T1. Uma particularidade desta fase é o uso do delinemaneto em blocos aumentados-DBA, o qual possibilita a avaliação de um grande número de clones sem a necessidade de utilização de repetições, sendo uma boa alternativa para estágios iniciais de seleção em programa de melhoramento de plantas (De Souza *et al.*, 2006).

Na fase T2, devido aos mesmos problemas de baixas correlações entre o comportamento em cana planta e soca, a seleção é efetuada em ambos os anos, tendo-se como variável-alvo a produção de Brix por unidade de área (Matsuoka *et al.*, 2005).

- **Terceira fase de seleção (T3)**

A terceira fase de seleção consiste na avaliação de algumas centenas de clones selecionados em T2. Como relatado na fase anterior, na fase T3 o delineamento utilizado também tem sido o delineamento em blocos aumentados (DBA), podendo este ser duplicado ou não, ou ainda, dentro de um mesmo local ou em diferentes regiões. No caso de avaliação em mais de um local procede-se com a multiplicação dos clones considerados.

Esta fase se caracteriza também, pelos testes de resistência a doenças, tais como mosaico e carvão, os quais podem eventualmente serem realizados em casa de vegetação.

- **Fase de multiplicação (FM)**

A fase de multiplicação consiste, basicamente, na multiplicação dos clones selecionados na fase T3, para obtenção de mudas a serem utilizadas na fase experimental. A partir desta fase, as universidades trocam entre si os clones selecionados.

Após terem sido multiplicados, os clones selecionados são enviados a diversos locais, em geral usinas e destilarias conveniadas, as quais variam de universidade para universidade, onde são obtidas as mudas.

- **Fase experimental (FE)**

Na fase experimental, ainda nas usinas e destilarias conveniadas às universidades, os clones promissores são avaliados em experimentos considerando-se o delineamento estatístico em blocos ao acaso, por três anos consecutivos e, quando possível, o experimento é repetido três vezes no mesmo local (Barbosa e Silveira, 2000; Matsuoka *et al.*, 2005). Segundo Ferreira *et al.* (2005) existe a necessidade do emprego de no mínimo três cortes, para que a seleção possa a ser praticada com previsibilidade do valor real do genótipo acima de 80%.

Paralelamente aos ensaios de competição, são conduzidos ensaios adicionais com o intuito de se obter a curva de maturação dos clones avaliados. O início da amostragem para se obter a Pol % cana, que corresponde à porcentagem de sacarose aparente contida na cana-de-açúcar, fibra, pureza e açúcares redutores, geralmente se inicia em abril e se estende por sete meses, no centro-sul do Brasil.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Análises dos caracteres agronômicos

O experimento foi conduzido no Centro de Pesquisa de Melhoramento de Cana-de-Açúcar-CECA, município de Oratórios, Minas Gerais. O plantio das mudas foi realizado em julho de 2007.

Utilizou-se o delineamento em blocos aumentados. O experimento foi composto por 286 clones e 2 testemunhas (RB867515 e SP80-1842) em 25 blocos. Os clones foram selecionados de 13 famílias de meios-irmãos e constituíram clones de primeira geração de propagação vegetativa (Fase T2). As avaliações ocorreram na fase T2 em cana-planta e cana-soca nos meses de julho de 2008 e 2009 respectivamente, foram feitas avaliações de caráter agronômico e análises tecnológicas. A parcela experimental constitui-se de um sulco de 5 metros de comprimento, espaçados de 1,40 m.

3.1.1. Tonelada de cana por hectare (TCH)

O número de colmos (NC) foi obtido por meio de contagem dos colmos dos 5 metros do sulco. A massa do colmo (MC) foi determinada por meio da pesagem em dinamômetro (com capacidade para 50 kg) de 10 colmos na parcela, escolhidos de forma aleatória. O valor obtido $((MC / 10) * NC)$ corresponde ao peso em 5 metros que foi convertido para o peso por hectare, conforme fórmula abaixo;

$$TCH = ((MC / 10) \times NC) \times (10000/7) / 1000$$

3.1.2. Diâmetro do colmo (DC)

Foi tomado por meio de paquímetro no quinto entrenó contados da base para cima em 10 colmos por parcela tomados aleatoriamente.

3.1.3. Comprimento dos colmos (AC)

Foi medido do comprimento a partir do nível do solo até o primeiro *dewlap* visível obtidas em 10 colmos por parcela.

3.1.4. Número de entrenós por colmo (NE)

Foi obtido por contagem do número de entrenós por colmos de uma amostra de 10 colmos por parcela.

3.2. Análises tecnológicas da cana-de-açúcar

As análises foram feitas na Usina Jatiboca (Urucânia-MG), conforme descrito em COPERSUCAR, (2001).

3.2.1. Determinação do brix no caldo extraído (BRIX %)

A determinação do brix refratométrico é o parâmetro mais utilizado nas indústrias de açúcar e álcool. Expressa a porcentagem peso/peso dos sólidos solúveis contidos em uma solução. A leitura foi realizada em refratômetro ótico com correção para 20°C. Cerca de 50 ml de caldo foram filtrados em algodão para realização da leitura. Com o auxílio de um bastão plástico, foram colocadas gotas de caldo filtrado sobre o prisma do refratômetro e em seguida, feita a leitura do brix.

3.2.2. Determinação da fibra na cana-de-açúcar (FB %)

A fibra é matéria seca, sendo insolúvel em água contida na cana-de-açúcar. Na fibra industrial o valor refere-se à análise da matéria-prima e, portanto, inclui as impurezas ou matérias estranhas que provocam aumento dos sólidos insolúveis. A fibra foi determinada em função do brix do caldo extraído da prensa hidráulica, peso do

bagaço úmido (PBU) onde é peso úmido (grama) do bagaço ou resíduo resultante da prensagem de 500g de cana ou matéria prima. Para o estado de Minas Gerais é utilizado a seguinte equação:

$$F \% = (0,1417 \times \text{PBU} - 7,8333)$$

3.2.3. Determinação da pol no caldo extraído (POL %)

A pol é a porcentagem em massa de sacarose contida em uma solução açucarada de peso normal, determinada pela capacidade que os açúcares têm de desviar a luz polarizada em uma única direção, sendo determinada por métodos sacarimétricos (polarímetros ou sacarímetros).

$$\text{Pol \%} = (1.0078 \times \text{leit. Sacar.} + 0.0444) \times (0.2607 - 0.001 \times \text{Brix})$$

3.2.4. Determinação da pol na cana-de-açúcar (PCC %)

A pol na cana é obtida em função da pol no caldo extraído multiplicado pela fibra e pelo coeficiente “C” que transforma a pol no caldo extraído em pol % cana. O coeficiente “C” representa a transformação do caldo extraído em todo o caldo absoluto, ou seja, é a extração de todo caldo proveniente da prensa hidráulica.

$$C = (0,9961 - 0,0041 \times \text{FB})$$

$$\text{PCC \%} = \text{pol} \times (1 - 0,01 \times \text{FB}) \times C$$

3.2.5. Determinação da pureza no caldo (Pureza %)

A pureza é a porcentagem de sacarose (pol) contida nos sólidos solúveis (brix), sendo o principal indicador de maturação da cana-de-açúcar.

$$\text{Pureza} = \text{pol} / \text{brix} \times 100$$

3.2.6. Determinação da matéria seca (MS %)

O peso do bagaço úmido (PBU) é peso úmido (grama) do resíduo resultante da prensagem de 500g de cana ou matéria prima. O peso do bagaço seco (PBS) foi obtido pela secagem dessa mesma amostra a 65° C até peso constante. Logo a % de MS é determinada pela seguinte fórmula:

$$\%MS = (PBS \times 100)/PBU$$

3.3. Análises da composição da parede celular

As análises foram realizadas no Laboratório de Fisiologia Molecular do Departamento de Biologia Vegetal e no Laboratório de Celulose e Papel do Departamento de Engenharia Florestal, ambos da Universidade Federal de Viçosa.

3.3.1. Lignina (LIG)

Dez colmos dos indivíduos da população analisada foram desintegrados e homogeneizados em uma prensa hidráulica. O caldo foi extraído, o bagaço seco em estufa por 24 horas a 105 °C e logo em seguida, moído e separado através de uma malha de 0,4 mm.

Os extrativos da amostra (2 a 3 gramas) foram sucessivamente extraídos com 200 mL de etanol 95% (NREL, 2004) em uma unidade de extração Soxhtec (MARCONI MA-004/491). Antes da extração, o material foi mantido em estufa por 24 horas a aproximadamente 45 °C.

As amostras livres de extrativos foram secas a 45 °C. Aproximadamente 300 mg do material foi colocado em tubos de 100 mL e adicionou-se 1,5 mL de H₂SO₄ 72% (v/v). Os tubos foram incubados a 45 °C por 7 minutos e após esse tempo, 20 ml de água destilada foi adicionado para diluição do ácido. As amostras foram autoclavadas a 121 °C, 15 psi por 30 minutos (ROCHA, 2000). A lignina foi separada do material hidrolisado da parede celular por filtração e o resíduo lavado com 20 mL de água destilada para a máxima remoção dos hidrolisados. A fração líquida do filtrado foi reservada e diluída em 100 mL. O processo de filtragem foi feito sob vácuo utilizando-se cadinhos de vidro sinterizado (Laborglas 2D 50mL), previamente pesados e identificados, os quais eram acoplados a um kitasato. Os cadinhos com sedimento de

lignina foram secos em estufa a 105 °C, até peso constante, e o teor de lignina Klason determinado gravimetricamente.

O teor de lignina solúvel foi determinado a partir de uma diluição de 1:10 do hidrolisado por espectrofotometria utilizando-se um comprimento de onda de 205 nm e um coeficiente de extinção de 105 L.g⁻¹.cm⁻¹ (DENCE, 1992). Utilizaram-se três repetições na análise de cada clone.

3.3.2. Celulose e hemicelulose (CEL e HEM)

As análises de celulose e hemicelulose foram realizadas em 20 genótipos, sendo 10 que possuem maior teor de lignina e 10 que possuem o menor teor de lignina.

Alíquotas dos hidrolisados do teor de lignina foram centrifugados a 10.000 x g, filtradas em membrana de nylon de 0,45 µm e analisadas em sistema cromatográfico Shimadzu modelo LC10AD, provido de um amostrador automático SIL 10A, degaseificador de fase móvel modelo DGU 14A, forno de aquecimento de coluna modelo CTO 10A e detectores RID 10A para índice de refração e SPD-M10Avp com rede de fotodiodos para espectrofotometria no ultravioleta. A análise foi realizada em coluna Aminex HPX-87H (Bio-Rad) a 65°C, precedida por pré-coluna Cation-H e eluída com fase móvel H₂SO₄ 8 mM a uma vazão de 0,6 mL/min. A quantificação foi efetuada por padronização externa, com base em curvas de calibração construídas para cada componente monitorado, celobiose, glicose, xilose, arabinose, ácido fórmico, ácido acético, hidroximetilfurfural e furfural, conforme a norma TAPPI 222 om-88.

3.4. Conversão de celulose e hemicelulose em glicose (GLIC)

3.4.1. Pré Tratamento do bagaço

Foram selecionados para determinação da GLIC 20 genótipos, sendo os 10 que possuíram maior teor de lignina e os 10 que possuíram o menor teor de lignina. O bagaço de cana triturado, na concentração 10% p/v foi submetido a um pré-tratamento em ácido sulfúrico 0,5% a 121° C em autoclave por 30 minutos. Posteriormente o líquido foi coletado por filtração a vácuo e o resíduo sólido foi lavado cinco vezes com 100 mL de água deionizada quente seguido de secagem a 50° C por 24 horas.

3.4.2. Ensaio enzimático e preparo da amostra para cromatografia líquida

À amostra de 1,5 g de bagaço seco foram adicionados 30 mL de solução de tampão citrato 50 mM. Após a homogeneização, foram adicionados 520 µL do pool de enzimas (Cellulase from *Trichoderma reesei* ATCC 2694) para conversão de hemicelulose e celulose a glicose.

A solução foi incubada a 52° C sob agitação de 150 rpm por 24 horas. Alíquotas de 1 mL foram retiradas de 4 em 4 horas para análise de produção de glicose.

As alíquotas foram centrifugadas a 12.000 x g para retirada de sedimentos do bagaço e filtradas em membranas de 0,22 µm.

3.4.3. Identificação e Quantificação de Glicose por CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)

A análise foi realizada em um Cromatógrafo Líquido de Alto Desempenho (HPLC), SHIMADZU, modelo SPD-10A VP acoplado a um detector de Índice de Refração marca RID-6AD. Coluna: Supelcosil – TmLC-NH2 (Supelco) de 30 cm x 4.5 mm de diâmetro com fluxo de 0,9 ml/minuto. Pressão na Coluna de 41 Kgf. A fase móvel foi Acetonitrila /Água (80:20) e o volume injetado foi de 20 µL. Os resultados foram comparados com uma curva padrão, construída com concentrações conhecidas de glicose ($Y = 661,89X + 104090$, $R^2 = 0,9982$) onde Y corresponde a área do pico no cromatograma e X concentração de glicose na amostra.

3.5. Análises estatísticas

3.5.1. Análise via modelos mistos

As análises estatísticas referentes ao conjunto de dados registrados na fase T2 para as caracteres TCH, DC, AC, NE, BRIX, FB, POL, PCC, Pureza, MS, LIG, CEL, HEM e GLIC foram realizadas pelo procedimento REML/BLUP, onde os componentes de variância foram estimados pela máxima verossimilhança restrita (REML) e os valores genotípicos preditos pela melhor predição linear não viesada (BLUP), conforme enfatizado por Resende (2002b).

As análises genético-estatísticas foram realizadas por meio do software computacional Selegen - REML/BLUP (Resende, 2002a e 2002b).

Dois modelos de análise foram considerados, ou seja, o modelo 20 (teste de clones no delineamento de blocos ao acaso com uma medição por parcela) o qual foi utilizado para analisar o conjunto de dados referentes as variáveis CEL, HEM e GLIC o modelo 70 (Delineamento em Blocos Aumentados com Testemunha de Efeito Aleatório), o qual foi utilizado para analisar o conjunto de dados referentes às variáveis TCH, DC, AC, NE, Acam, BRIX, FB, POL, PCC, Pureza, MS e LIG. Os valores iniciais considerados para os parâmetros e para a taxa de erro foi de 0,00001

O modelo 20 e 70 são descritos abaixo (Resende, 2002a, 2002b).

3.5.1.1. Modelo 70

Este modelo é adequado para análise de delineamento em blocos aumentados com medidas repetidas, testemunha como efeito aleatório.

O modelo estatístico é dado por:

$$y = X_m + Z_g + W_b + T_p + e$$

em que:

y: é o vetor de dados

m: é o vetor dos efeitos assumidos como fixos (medições)

g: é o vetor dos efeitos genotípicos (assumidos como aleatórios)

b: efeito fixo do j-ésimo bloco (j = 1, 2, ..., B)

p: é o vetor dos efeitos ambientais de blocos (assumidos como aleatórios)

e: e é o vetor de erros ou resíduos (aleatórios)

X, Z, W e T: as matrizes de incidência para os referidos efeitos.

O arquivo de resultados pelo modelo 70 forneceu os seguintes componentes de variância (REML individual) e componentes de média (BLUP individual):

1. Componentes de variância

V_g: variância genotípica

V_{bloc}: variância ambiental entre blocos

V_{perm} : variância de ambiente permanente

V_e : variância residual (ambiental)

V_f : variância fenotípica individual

h^2_g : herdabilidade individual no sentido amplo no bloco, ou seja, dos efeitos genotípicos

r : repetibilidade de parcelas individuais.

$c^2_{bloc} = c^2$: coeficiente de determinação dos efeitos de bloco.

$c^2_{perm} = c^{21}$: coeficiente de determinação dos efeitos de ambiente permanente.

m : média geral do experimento.

2. Componentes de média (BLUPs individuais)

Os efeitos genotípicos ($g = a + d$) e os valores genotípicos preditos ($\mu + g$) foram utilizados para computar os ganhos genéticos e a média da população melhorada.

3.5.1.2. Modelo 20

O modelo estatístico é dado por:

$$y = Xr + Zg + e$$

em que:

y : é o vetor de dados

r : é o vetor dos efeitos de repetição (assumidos como fixos)

g : é o vetor dos efeitos genotípicos (assumidos como aleatórios)

e : é o vetor de erros ou resíduos (aleatórios)

X , Z , W e T : as matrizes de incidência para os referidos efeitos.

Em relação ao arquivo de resultados pelo modelo 20, os seguintes componentes de variância (REML individual) e componentes de média (BLUP individual) foram fornecidos:

1. Componentes de variância

V_g : variância genotípica

V_e : variância residual (ambiental)

V_f : variância fenotípica individual

h_g^2 : herdabilidade individual no sentido amplo no bloco, ou seja, dos efeitos genotípicos

h_{mc}^2 : herdabilidade da média de clone, assumindo estande completo

A_{cclon} : acurácia da seleção de clones, assumindo estande completo

m: média geral do experimento.

2. Componentes de média (BLUPs individuais)

Os efeitos genotípicos ($g = a + d$) e os valores genotípicos preditos ($\mu + g$) foram utilizados para computar os ganhos genéticos e a média da população melhorada.

3.5.2. Análise de trilha

Para obtenção da matriz de correlação foram utilizados os valores genotípicos preditos fornecidos pelo programa Selegen. Realizou-se também o diagnóstico de multicolinearidade nas matrizes de correlações genotípicas das variáveis explicativas (TCH, DC, AC, NE, Brix, FB, POL, PCC, Pureza, MS, LIG, Hem e Cel) sobre a variável principal (Glic), de acordo com critérios estabelecidos por MONTGOMERY & PECK (1981), resultando em multicolinearidade severa. Na ocorrência de multicolinearidade severa entre as variáveis explicativas sobre a variável principal, adotou-se a eliminação dos caracteres do modelo de regressão que estão provocando maiores problemas: Brix, PCC, Pureza e MS.

Neste contexto, realizou-se desdobramento das correlações que não apresentaram multicolinearidade severa em efeitos diretos e indiretos por meio da análise de trilha desenvolvida por WRIGHT (1921), citado por CRUZ *et al.* (2004). Um esquema de diagrama causal mostrando o inter-relacionamento das variáveis analisadas é apresentado na Figura 11. Nesses diagramas, a seta unidirecional indica efeito direto (coeficiente de trilha) de cada variável explicativa, enquanto a seta bidirecional representa a interdependência de duas variáveis explicativas, cuja magnitude é quantificada pela correlação dos valores genotípicos.

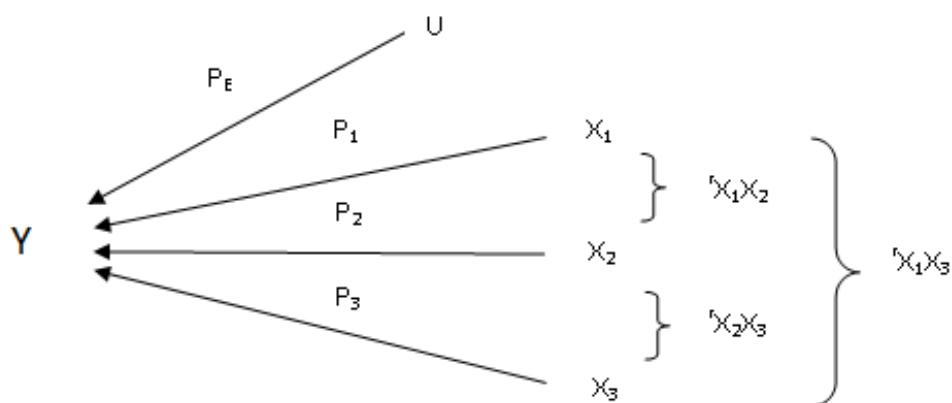


Figura 11: Diagrama ilustrativo das relações de causa e efeito das variáveis explicativas (X_1 , X_2 e X_3) e residual (U) sobre a variável principal (Y). P_i : medida do efeito direto da variável i :

A diagnose da multicolinearidade, e as análises de trilha foram efetuadas pelo programa computacional GENES (CRUZ, 2001).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Estimativas dos Parâmetros genéticos

O sucesso de qualquer programa de melhoramento depende, essencialmente, da quantidade de variabilidade genética existente na população base a ser explorada, da herdabilidade do caráter que está sendo melhorado e da extensão do ganho genético possível para este caráter. As estimativas dos parâmetros genéticos referentes à fase T2, primeiro e segundo corte podem ser observadas na tabela 3.

Na fase T2 detectou-se relação CV_g/CV_e superior à unidade para o caráter diâmetro do colmo (DC) (1,04), e maior valor h^2_g (0,5187) refletindo uma situação favorável para seleção. Similarmente Singh *et al.* (1981) relataram uma menor influência do ambiente nos caracteres DC, ao estudar 48 cultivares de cana-de-açúcar.

Dentre os vários parâmetros genéticos estudados em uma população, o mais considerado por melhoristas, com o intuito de investigar a natureza da variabilidade observada, segundo Falconer (1980), é a herdabilidade, devido ao fato desta levar em conta todos os componentes de variância.

Tabela 3 Estimativas dos parâmetros genéticos obtidos pelo procedimento REML/BLUP utilizando 286 genótipos de cana-de-açúcar, referentes ao primeiro e segundo corte da segunda fase de seleção (T2). Viçosa, 2010.

Parâmetros ⁽²⁾	Caracteres ⁽¹⁾						
	TCH	POL	FB	DC	AL	NE	LIG
σ^2_g	229,847	0,017	0,122	0,039	0,032	1,105	0,333
σ^2_{bloc}	7,51	0,046	0,076	0,0022	0,023	0,271	0,041
σ^2_e	654,694	2,539	1,767	0,036	0,096	3,859	3,013
σ^2_f	911,223	2,759	1,987	0,076	0,152	5,278	3,53
h^2_g	0,2522	0,0360	0,0615	0,5187	0,2078	0,2094	0,0944
	± 0,0553	± 0,0085	± 0,0271	± 0,0788	± 0,0499	± 0,0500	± 0,0336
CV_g	18,836	0,776	3,159	7,552	6,670	5,490	2,355
CV_e	31,789	9,483	12,021	7,256	11,553	10,260	7,083
CV_g/CV_e	0,593	0,082	0,263	1,041	0,577	0,535	0,332
r	0,2815	0,0796	0,1107	0,5286	0,3689	0,2689	0,1464
	± 0,0584	± 0,0309	± 0,0364	± 0,0795	± 0,0664	± 0,0567	± 0,0419
m	80,489	16,803	11,058	2,615	2,682	19,147	24,507

(1) TCH: toneladas de colmos por hectare; POL: porcentagem aparente de sacarose contida no caldo de cana, FB: porcentagem de fibra; DC: diâmetro de colmos; AC: altura de colmos; NE: número de entrenós por colmo e LIG: porcentagem de lignina no bagaço.

(2) Estimativas dos componentes de variância genotípica entre clones (σ^2_g), variância ambiental entre blocos (σ^2_{bloc}), variância residual (ambiental) (σ^2_e), variância fenotípica individual (σ^2_f), herdabilidade em nível de indivíduo no sentido amplo no bloco (h^2_g) ± desvio, repetibilidade de parcelas individuais (r), coeficiente de variação genético (CV_g), coeficiente de variação ambiental (CV_e), relação coeficiente de variação genético (CV_g) / coeficiente de variação ambiental (CV_e) e média geral (m)

Bressiani (1993) também relatou grandes variações nas estimativas de herdabilidade entre as três primeiras fases de seleção. De acordo com este autor tal fato pode ser atribuído, principalmente, a três fatores: baixa precisão na determinação do valor médio dos pais, número de cruzamentos envolvidos no estudo e interação entre genótipos e fases de seleção.

Geralmente, a seleção visual realizada na fase inicial, em grande parte dos programas de melhoramento da cana-de-açúcar, é realizada de forma indireta, ou seja, a seleção do caráter principal baseia-se em caracteres secundários. Dentre outros caracteres considerados nesta fase, maior ênfase tem sido dada à avaliação do Brix e resistência a algumas doenças, como ferrugem e carvão, por apresentarem maior herdabilidade (Skinner *et al.*, 1987, Bressiani, 2001; Matsuoka *et al.*, 2005). Pela magnitude das estimativas de h^2_g e da relação CV_g/CV_e para o DC, maior avanço genético esperado - AGE seria esperado caso para este caráter.

Adicionalmente, observou-se também que os desvios associados as estimativas de h^2_g foram moderados, exceto para o caráter lignina, o qual apresentou valor cerca de 37% da estimativa de h^2_g para o caráter e ambiente em questão.

Outro parâmetro importante para seleção de clones em cana-de-açúcar é a repetibilidade. No Brasil tem sido realizadas cinco colheitas em anos sucessivos para determinada área plantada. Logo, para efeito de seleção dos clones se faz necessário obter inferências sobre o número de colheitas que deveriam ser realizadas em experimentos de competição de clones, para se obter elevada determinação sobre o valor real dos genótipos.

Neste sentido, observa-se pela Tabela 3 que a repetibilidade foi baixa para a maioria dos caracteres avaliados, o que indica que não houve regularidade na repetição do caráter entre cana-planta e soca. A predição do valor real dos indivíduos com duas medições conduziram a coeficientes de determinação (R^2) na ordem de 69% para DC e de apenas 12% para POL. Logo a seleção para tais caracteres nesta fase deve ser branda, uma vez que torna inviável aumentar o número de colheitas para 5 ou 6 visando incrementar a determinação para cerca de 80% ou mais.

Na fase T2, milhares de genótipos têm sido avaliados pela RIDESA, no entanto apenas cerca de 20%, em média, são selecionados. Para tanto tem sido utilizado Delineamento de Blocos Aumentados- DBA (Federer, 1956). Este delineamento permite a avaliação dos genótipos sem a necessidade de emprego de repetições, contornando assim, o problema relacionado à limitação de material propagativo, observados nas fases iniciais de seleção, e possibilitando a avaliação de um grande número de genótipos. Souza, Peternelli e Barbosa (2006) sugerem o uso do DBA, uma vez que esses autores observaram a ótima eficiência do DBA em relação a outros delineamentos avaliados para predição dos valores genotípicos e estimativas de parâmetros genéticos.

4.2. Predição dos valores genotípicos

O sucesso do melhoramento genético depende, sobretudo, da adoção de procedimentos acurados de seleção, os quais se baseiam tanto na estimação dos componentes de variância, quanto na predição dos valores genéticos. Como relatado por Resende (2002), no caso de seleção e clonagem de genótipos avaliados em testes de progênes, torna-se imprescindível a predição dos valores genotípicos e não apenas dos valores genéticos aditivos.

As médias genotípicas (m) e os avanços genéticos esperados (AGEs) sob três proporções de seleção (10, 20 e 40%) dos caracteres avaliados na fase T2 estão apresentados na Tabela 4. Os AGEs na proporção de seleção de 10%, para todos os caracteres avaliados foram quase duas vezes superiores que na proporção de seleção de 40%

Tabela 4. Médias genotípicas (m) e avanços genéticos esperados (AGEs) para três proporções de seleção (10, 20 e 40%), para os caracteres avaliados na segunda fase de seleção (fase T2). Viçosa, 2010.

Caracteres	m	Avanço genético esperado		
		Proporção de Seleção (%)		
		10	20	40
		% de m		
TCH (ton)	80,49	22,27	17,48	11,53
POL (%)	16,80	0,14	0,11	0,08
FB (%)	11,06	2,03	1,59	1,08
DC (cm)	2,61	11,87	9,04	6,14
AC (m)	2,68	7,03	5,57	3,85
NE	19,15	6,14	4,67	3,13
LIG (%)	24,51	1,79	1,43	0,98

(1) TCH: toneladas de colmos por hectare; POL: porcentagem aparente de sacarose contida no caldo de cana, FB: porcentagem de fibra; DC: diâmetro de colmos; AC: altura de colmos; NE: número de entrenós por colmo e LIG: porcentagem de lignina no bagaço.

Considerando a fase T2, com exceção da TCH, observa-se que o caráter DC foi um que apresentou o maior AGE nas três proporções de seleção (11,87, 9,04 e 6,14% para as proporções de 10, 20 e 40%, respectivamente). Este resultado, aliado às maiores estimativas obtidas para a relação CV_g/CV_e , e herdabilidade para a DC evidencia que grandes ganhos podem ser obtidos com a seleção para este caráter na fase T2. Estes resultados estão de acordo com aqueles relatados por Sharma e Singh (1998), que ao avaliar genótipos de três diferentes origens observaram taxas de AGE que variaram de 9,60 a 12% para DC. O caráter lignina, por outro lado, foi o que apresentou um dos menores AGE (1,79, 1,43, e 0,98% para as proporções de 10, 20 e 40% respectivamente). Este resultado, aliado às menores estimativas obtidas para a relação CV_g/CV_e , e herdabilidade para a lignina evidencia a necessidade de avaliar a variabilidade genética de lignina em outras populações, uma vez que nesse presente estudo os ganhos estimados foram muito baixos.

4.3. Análise de trilha

O estudo de correlações é uma medida de associação e não permite tirar conclusões sobre o estudo da relação de causa e efeito. Por isso, procedeu-se à análise de trilha, que investiga a relação de causa e efeito. Silva *et al.* (2005) mencionam que esta análise proporciona um conhecimento detalhado das influências dos caracteres envolvidos, e justificam a existência de correlações positivas e negativas, de alta e baixa magnitude, entre os caracteres estudados.

Para a análise de trilha foram utilizados os valores genotípicos de vinte clones, sendo dez clones com maior teor de lignina e outros dez com menor teor (Tabela 4). Observou-se diferença de 20%, aproximadamente, entre os valores genotípicos para a glicose liberada pela hidrólise enzimática dos clones classificados com maior e menor teor de lignina. As diferenças percentuais entre os valores genotípicos para os demais caracteres foram menores, sendo 8% para TCH.

Conforme observado na Tabela 6, os caracteres que apresentaram correlações significativas com a glicose liberada na hidrólise enzimática foram: diâmetro do colmo (-0.478); lignina (-0.4829); celulose (-0.6335); e hemicelulose (0.8188). Depreende-se desses resultados que a liberação de glicose na hidrólise enzimática encontra-se diretamente relacionada à quantidade de hemicelulose presente no bagaço da cana-de-açúcar. Com relação ao diâmetro do colmo, teor de lignina e celulose as estimativas revelaram correlação negativa, o que demonstra uma associação inversa entre os caracteres.

Cruz & Carneiro (2003) ressaltam que quando um caráter correlaciona-se positivamente com alguns e negativamente com outros, há a indicação de se ter um cuidado adicional, pois, ao selecionar-se um determinado caráter, pode-se provocar mudanças indesejáveis em outros. Tais correlações são indicação da dificuldade que poderá haver em selecionar clones que venham a ter elevada eficiência de sacarificação a partir do bagaço.

Para obtenção dos efeitos diretos e indiretos da análise de trilha, é necessário que a matriz $X'X$ seja bem condicionada. Problemas de multicolinearidade podem torná-la singular, e fazer, conseqüentemente, com que as estimativas de quadrados mínimos não sejam viáveis (Cruz, 2001). O diagnóstico da multicolinearidade da matriz de correlações genotípicas, após terem sido eliminados os caracteres Brix, PCC, Pureza e MS, indicou Número de Condição menor que 100, o que caracteriza multicolinearidade

fraca e não se constitui em um problema para a análise de trilha conforme MONTGOMERY & PECK (1981).

Tabela 5: Valores genotípicos dos caracteres agrônômicos e bioquímicos dos 20 clones selecionados para maior e menor teor de lignina.

Clone	Lignina (%)	TCH (ton)	POL (%)	FB (%)	DC (cm)	AC (m)	NE	Cel (%)	Hem (%)	Glic (%)
50	25,29	89,35	16,82	11,37	2,27	2,61	20,68	45,09	31,7	9,29
321	25,17	79,66	16,79	11,01	2,88	2,79	20,12	44,39	31,95	10
349	25,13	66,56	16,81	11,01	2,9	2,69	19,49	44,53	30,19	9,44
8	25,07	80,81	16,82	11,06	2,52	2,59	19,53	44,56	32,74	10,02
140	25,03	81,12	16,81	11,28	2,93	2,69	19,78	44,83	33,27	9,21
322	25,02	84,66	16,83	11,04	2,57	2,74	18,85	44,63	33,1	9,72
323	24,99	87,75	16,8	11,09	2,85	2,77	19,03	43,78	32,62	8,9
20	24,99	76,78	16,82	10,98	2,52	2,74	20,13	46,08	31,17	9,81
87	24,99	79,29	16,81	11,35	2,45	2,6	19,12	44,2	30,86	10,39
164	24,94	95,04	16,81	11,3	2,47	2,59	18,51	44,39	30,46	8,59
121	24,52	80,56	16,79	11,08	2,56	2,67	18,42	43,91	31,12	10,15
175	24,06	83,36	16,8	11,1	2,59	2,72	19,77	44,55	34,33	11,99
89	24,06	83,84	16,81	11,14	2,41	2,66	18,75	46,75	31,06	12
58	24,06	84,89	16,77	10,92	2,82	2,73	18,88	47,37	31,45	10,71
45	24,03	78,57	16,79	10,95	2,57	2,54	19,54	45,14	35,13	11,13
75	24,04	63,76	16,81	11,09	2,77	2,54	18,45	44,65	31,42	14,07
166	24,02	69,93	16,81	11,03	2,68	2,6	19,29	46,5	32,87	9,99
53	23,98	78,1	16,8	10,91	2,41	2,69	17,83	43,04	38,5	13,8
66	23,95	64,23	16,8	11,05	2,57	2,41	19,39	45,91	32,35	12,05
146	23,88	71,23	16,8	10,98	2,23	2,59	19,07	41,08	33,43	12,73
Média (10 mais)	25,06	82,10	16,81	11,15	2,64	2,68	19,52	44,65	31,81	9,54
Média (10 menos)	24,06	75,85	16,80	11,03	2,56	2,62	18,94	44,89	33,17	11,86

(1) TCH: toneladas de colmos por hectare ; POL: porcentagem aparente de sacarose contida no caldo de cana, FB: porcentagem de fibra; DC: diâmetro de colmos,

AC: altura de colmos; NE: número de entrenós por colmo; LIG: porcentagem de lignina no bagaço; CEL: porcentagem de celulose no bagaço; HEM: porcentagem

de hemicelulose no bagaço e GLIC: Glicose produzida na hidrólise enzimática.

Tabela 6. Coeficiente de correlação entre dez caracteres, avaliados em cana-de-açúcar

Caracteres⁽¹⁾	POL	FB	DC	AC	NE	LIG	CEL	HEM	GLIC
TCH	0.0196	0.4199	-0.1817	<u>0.4433*</u>	0.043	0.4209	0.042	-0.2178	-0.3192
POL		0.4169	-0.2867	-0.083	0.2031	0.3951	-0.0574	-0.1035	-0.1668
FB			-0.1895	-0.171	0.2334	<u>0.483*</u>	-0.008	-0.2360	-0.386
DC				0.3692	0.0864	0.067	0.2868	-0.4376	<u>-0.478*</u>
AC					0.0866	0.3112	-0.0258	-0.1397	-0.165
NE						<u>0.4866*</u>	0.2246	-0.0836	-0.3861
LIG							-0.1874	-0.2572	<u>-0.4829*</u>
CEL								<u>-0.6606**</u>	<u>-0.6335**</u>
HEM									<u>0.8188**</u>

** , * : Significativo a 1 e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste t.

(1) TCH: toneladas de colmos por hectare ; POL: porcentagem aparente de sacarose contida no caldo de cana, FB: porcentagem de fibra; DC: diâmetro de colmos; AC: altura de colmos; NE: número de entrenós por colmo; LIG: porcentagem de lignina no bagaço; CEL: porcentagem de celulose no bagaço; HEM: porcentagem de hemicelulose no bagaço e GLIC: Glicose produzida na hidrólise enzimática.

Na análise de trilha na tabela 7 o caráter lignina apresenta correlação negativa (-0,4829) e efeito direto alto (-0,3617) na produção de glicose a partir do bagaço de cana, o que indica que a seleção específica da cana-de-açúcar com teores menores de lignina pode proporcionar ganho na glicose liberada na hidrólise enzimática. O efeito direto foi o que mais contribuiu (aproximadamente 75%) para correlação.

A coorelação (-0,4829) demonstra que quanto maior o teor de lignina presente no bagaço menor será a produção de glicose (Figura 12). A lignina é uma substância amorfa, de natureza aromática e muito complexa, e faz parte da parede celular e da lamela média dos vegetais (MORAIS 1987, 1992). Apesar de todos os estudos realizados até hoje sobre lignina, muitos pontos, relativos principalmente à sua estrutura, permanecem em dúvida. Na produção de etanol celulósico, a lignina dificulta o acesso de enzimas hidrolíticas aos carboidratos fermentáveis, acarretando perdas no processo e aumentando o custo de produção, uma vez que a enzima é consumida no decorrer do processo (OLIVA *et al.*, 2006). Há estudos que mostram que o ácido fórmico e as unidades precursoras de lignina inibem as celulasas (PANAGIOTOU & OLSSON, 2007; CANTARELLA *et al.* 2004). Além disso, a hidrofobicidade da lignina pode promover a adsorção das celulasas (JORGENSEN & OLSSON, 2006; LU *et al.*, 2002; BERLIN *et al.*, 2005). Dixon *et al.* (2008) promoveram alterações nas etapas finais da via de biossíntese da lignina da alfafa (*Medicago sativa*). Após a regulação de duas enzimas da rota foi observado um aumento de 50 a 60% da eficiência de sacarificação da biomassa.

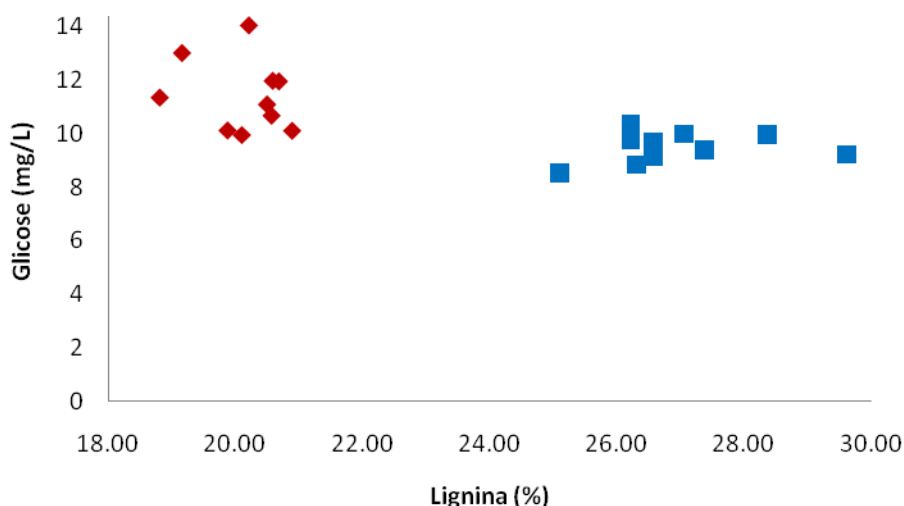


Figura 12: Quantificação de glicose liberada após hidrólise enzimática dos 10 clones com maior teor de lignina (Quadrados) e os 10 clones com menor teor de lignina (Losangos)

Quanto à celulose, o coeficiente de correlação com a glicose liberada na hidrólise enzimática foi negativo (-0,6335) e estatisticamente significativo, sendo seu efeito direto elevado (-0,4167) (Tabela 7), correspondendo a 66%. Significa que quanto o maior o teor de celulose menor a produção de glicose a partir do bagaço de cana. Essa correlação pode ser explicada pela estrutura que a celulose apresenta. É um polímero linear de moléculas de celobiose que constitui aproximadamente 50% da massa seca do bagaço, apresentando em sua estrutura subunidades de β -D glicose unidas por ligações glicosídicas do tipo β (1,4) (PÉREZ *et al.*, 2002). O conjunto de longas cadeias de celulose (fibrilas elementares) dá origem às chamadas macrofibrilas, que ajudam a compor a estrutura da parede celular. Porém essas macrofibrilas organizam-se em uma estrutura compacta e cristalina dificultando a ação da enzima no processo de sacarificação. Gould (2004) conduziu o pré tratamento para resíduos agrícolas e concluiu que é um método simples e eficaz para melhorar a digestibilidade enzimática da matéria lignocelulósica (celulose e hemicelulose) para níveis onde a eficiência atinge cerca de 90%.

Na interpretação de uma análise de trilha deve-se levar em consideração alguns pontos essenciais, conforme indicado por SINGH & CHANDHARY, (1979), citado por VENCOVSKY *et al.* (1992). Se o coeficiente de correlação entre a variável explicativa e a variável principal for igual ao seu efeito direto, em magnitude e sinal, esta correlação explica a verdadeira associação existente. No presente trabalho, a situação

que mais se aproxima foi caráter hemicelulose apresentou alta correlação positiva (0,8188) com a eficiência de sacarificação e efeito direto baixo (0,2437), o que indica que a seleção única deste caráter pode não proporcionar ganho satisfatório na produção de glicose a partir do bagaço de cana (Tabela 7). Porém, nos remete a uma importante colocação acerca do seu papel na estruturação da parede celular e sua influência na eficiência de sacarificação. A celulose é constituída por regiões amorfas e cristalinas. As microfibrilas de celulose na região amorfa são envolvidas por hemiceluloses e lignina. Neste trabalho foi analisada a eficiência de sacarificação em resíduo de bagaço pré-tratado. O pré-tratamento afrouxa a estrutura da fibra pela degradação dos domínios de parede mais susceptíveis a este tratamento, sendo que o domínio cristalino das microfibrilas de celulose apresentam elevada recalcitrância tanto a pré-tratamento enzimático quanto ao químico. Assim, o efeito positivo do teor de hemicelulose observado na eficiência de sacarificação se explicaria pela redução da cristalinidade da celulose o que a tornaria mais acessível às enzimas hidrolíticas (Figura 13).

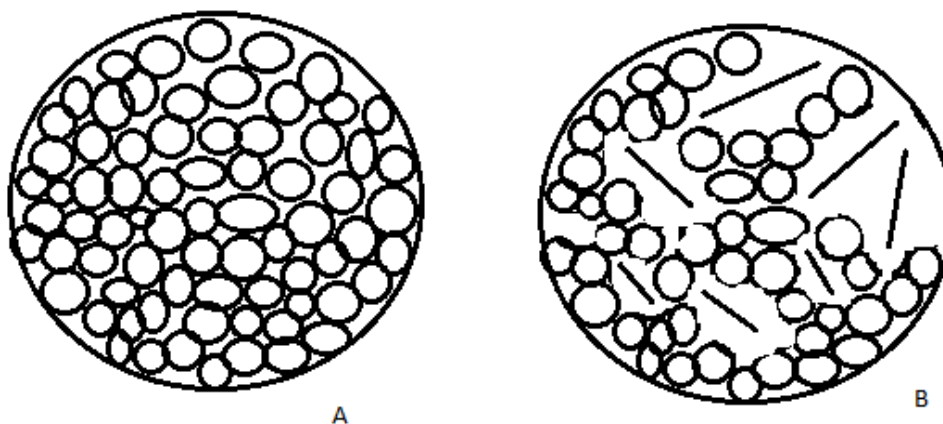


Figura 13: Estrutura da parede celular: (A) presença de celulose da forma compacta e cristalina e (B) presença da hemicelulose abrindo a estrutura da celulose.

Tabela 7: Estimativas dos efeitos diretos e indiretos dos componentes: TCH, POL, FB, DC, AC, NE, LG, CEL, HEM sobre a produção de glicose a partir do bagaço.

Caracteres⁽¹⁾	Estimativa
TCH	
Efeito direto sobre a glicose	-0,2168
Efeito indireto POL	-0,0014
Efeito indireto FB	-0,0264
Efeito indireto DC	0,0664
Efeito indireto AC	0,0836
Efeito indireto NE	-0,0018
Efeito indireto LG	-0,1522
Efeito indireto CEL	-0,0175
Efeito indireto HEM	-0,0530
Total	-0,3192
POL	
Efeito direto sobre a glicose	-0,0726
Efeito indireto TCH	-0,0042
Efeito indireto FB	-0,0262
Efeito indireto DC	0,1048
Efeito indireto AC	-0,0156
Efeito indireto NE	-0,0085
Efeito indireto LG	-0,1429
Efeito indireto CEL	0,0239
Efeito indireto HEM	-0,0252
Total	-0,1668
FB	
Efeito direto sobre a glicose	-0,0697
Efeito indireto TCH	-0,0910
Efeito indireto POL	-0,0302
Efeito indireto DC	0,0692
Efeito indireto AC	-0,0322
Efeito indireto NE	-0,0098
Efeito indireto LG	-0,1747
Efeito indireto CEL	-0,0033
Efeito indireto HEM	-0,0575
Total	-0,386
DC	
Efeito direto sobre a glicose	-0,3656
Efeito indireto TCH	0,0393
Efeito indireto POL	0,0208
Efeito indireto FIB	0,0119
Efeito indireto AC	0,0696
Efeito indireto NE	-0,0036
Efeito indireto LG	-0,0242
Efeito indireto CEL	-0,1195
Efeito indireto HEM	-0,1066
Total	-0,4778
AC	
Efeito direto sobre a glicose	0,1887
Efeito indireto TCH	-0,0961
Efeito indireto POL	0,0060
Efeito indireto FIB	0,0107
Efeito indireto DC	-0,1349
Efeito indireto NE	-0,0036

	Efeito indireto LIG	-0,1125	
	Efeito indireto CEL	0,0107	
	Efeito indireto HEM	-0,0340	
	Total		-0,165
NE	Efeito direto sobre a glicose	-0,0420	
	Efeito indireto TCH	-0,0093	
	Efeito indireto POL	-0,0147	
	Efeito indireto FIB	-0,0146	
	Efeito indireto DC	-0,0315	
	Efeito indireto AC	0,0163	
	Efeito indireto LIG	-0,1760	
	Efeito indireto CEL	-0,0935	
	Efeito indireto HEM	-0,0237	
	Total		-0,3861
LIG	Efeito direto sobre a glicose	-0,3617	
	Efeito indireto TCH	-0,0912	
	Efeito indireto POL	-0,0286	
	Efeito indireto FIB	-0,0304	
	Efeito indireto DC	-0,0244	
	Efeito indireto AC	0,0587	
	Efeito indireto NE	-0,0204	
	Efeito indireto CEL	0,0780	
	Efeito indireto HEM	-0,0626	
	Total		-0,4829
CEL	Efeito direto sobre a glicose	-0,4167	
	Efeito indireto TCH	-0,0091	
	Efeito indireto POL	0,0041	
	Efeito indireto FIB	0,0005	
	Efeito indireto DC	-0,1048	
	Efeito indireto AC	-0,0048	
	Efeito indireto NE	-0,0094	
	Efeito indireto LIG	0,0677	
	Efeito indireto HEM	-0,1609	
	Total		-0,6335
HEM	Efeito direto sobre a glicose	0,2437	
	Efeito indireto TCH	0,0472	
	Efeito indireto POL	0,0075	
	Efeito indireto FIB	0,0148	
	Efeito indireto DC	0,1599	
	Efeito indireto AC	-0,0263	
	Efeito indireto NE	0,0035	
	Efeito indireto LIG	0,0930	
	Efeito indireto CEL	0,2752	
	Total		0,8188
	P_{ε}	0,3104	
	R^2	0,9036	

P_{ε} : efeito da variável residual; R^2 : coeficiente de determinação.

(I) TCH: toneladas de colmos por hectare ; POL: porcentagem aparente de sacarose contida no caldo de cana, FB; porcentagem de fibra; DC: diâmetro de colmos; AC: altura de colmos; NE: número de entrenós por colmo; LIG: porcentagem de lignina no bagaço; CEL: porcentagem de celulose no bagaço; HEM: porcentagem de hemicelulose no bagaço e GLIC: Teor de Glicose na hidrólise enzimática.

O caráter diâmetro do colmo (DC) apresentou correlação negativa (-0,4778) e o efeito direto sobre a produção de glicose representou cerca de 76% da associação, demonstrando que quanto maior o diâmetro do colmo menor a quantidade de glicose produzida a partir do bagaço da cana. Diâmetro do colmo é uma característica anatômica e seu efeito sobre a produção de glicose só pode ser explicado via desta característica com outras secundárias. Ao se analisar a relação entre DC e hemicelulose, encontrou-se alta correlação negativa, -0.4376 (Tabela 6). Além disso, o teor de hemicelulose apresentou uma forte correlação negativa com o teor de celulose (-0.6606). Assim, possivelmente, DC estaria ligado ao aumento da cristalinidade da celulose pela redução da hemicelulose e portanto, diminuição da eficiência de sacarificação.

O caráter número de entre nós (NE) apresentou baixa correlação negativa (-0,3861), não foi significativa. Mas pode se sugerir que um maior número de entre nós está correlacionado a uma maior deposição de lignina pois estes caracteres apresentaram uma correlação positiva significativa. A correlação ilustrada na tabela 6 mostra que o NE tem uma correlação significativa com o teor de lignina (0.4866). Depreende-se portanto, que um elevado número de entrenós pode estar relacionado a uma maior deposição de lignina, o que cessaria o crescimento em extensão do entrenó levando a cana a produzir um novo entrenó. Rocha (1996) para cevada e aveia relatou que menor deposição de lignina torna os colmos mais susceptíveis ao acamamento. Isso pode ser observado no efeito indireto da lignina que possui a maior contribuição em cerca de 46 %.

Para o caráter altura do colmo (AC) não há relação de causa e efeito, pois, estes apresentam correlação negativa e efeito direto positivo, sendo essa correlação explicada pelos efeitos indiretos. Neste caso os fatores indiretos devem ser considerados simultaneamente no processo de seleção (VENCOVSKY et AL, 1992).

O parâmetro porcentagem em massa da sacarose (pol) possui correlação negativa (-0,1668) mas não significativa. Observa-se que o efeito indireto via lignina possui a maior contribuição correspondendo a 85% do total. Sugerindo a importância do parâmetro lignina na correlação.

O parâmetro fibra (FB) apresentou correlação baixa negativa (-0,386) e não significativo. E o efeito indireto que apresentou maior contribuição foi via lignina de aproximadamente 45%.

Por fim o caráter tonelada de cana por hectare (TCH) apresentou correlação negativa baixa (-0,3192) , mas não significativa. Mas pode se ressaltar que o efeito direto sobre produção de glicose demonstrou a maior contribuição (68%).

O coeficiente de determinação (R^2) igual a 0.9036 e o baixo efeito residual (0,3104) representam satisfatoriamente a contribuição das variáveis explicativas para a variável principal, quantidade de glicose liberada na hidrólise enzimática no bagaço.

Os resultados apresentados sugerem que as variáveis explicativas não devem ser totalmente descartadas devido ao baixo efeito direto sobre a variável principal, pois o índice de seleção poderá proporcionar bons resultados, uma vez que, este índice constitui um caráter adicional formado pela combinação de vários caracteres, possibilitando ganhos favoráveis e simultâneos em várias características (CRUZ & REGAZZI, 1994).

De modo geral, os nove caracteres estudados diferiram em seu grau de influência direta sobre glicose liberada na hidrólise enzimática no bagaço. Entre eles, a celulose, lignina e diâmetro de colmos foram os que tiveram efeitos relativamente altos, o que indica a relação de causa e efeito. Esse caráter está relacionado a ganhos no teor de glicose liberada na hidrólise enzimática. Os caracteres hemicelulose e número de entrenós podem ser considerados secundários na influência sobre o teor de glicose na hidrólise.

O POL, fibra, altura do colmo e toneladas de colmos por hectare apesar do efeito direto baixo, têm certamente efeitos indiretos não desprezíveis e negativos. Estes efeitos estão principalmente relacionados aos efeitos indiretos da variável secundária lignina.

A presença de efeitos indiretos negativos mostra a dificuldade que se tem em selecionar apenas com base no comportamento da variável principal. Vencosvsky & Barriga (1992) relatam que, aparentemente, ainda não se tem um método adequado para maximizar a resposta à seleção e considerar apenas os componentes principais da variável principal. Portanto, quando o processo de seleção for baseado apenas em teor de glicose na hidrólise, haverá perda do controle sobre o comportamento e o equilíbrio harmônico que devem existir entre seus componentes, requisito básico que caracteriza uma boa cultivar de cana-de-açúcar.

5. CONCLUSÕES

- a) A população avaliada apresentou baixa variabilidade genética para os caracteres avaliados, exceto para diâmetro de colmo.
- b) O presente trabalho conclui que não há caráter agrônômico que possa ser utilizado de forma independente e eficaz para a seleção de genótipos para alta eficiência de sacarificação. De todos os caracteres agrônômicos avaliados nos 20 clones previamente selecionados para alto e baixo teor de lignina, o que melhor se correlacionou com a glicose liberada da hidrólise enzimática foi o diâmetro de colmo.
- c) Os caracteres bioquímicos (celulose, hemicelulose e lignina) apresentam alto valor de correlação, sendo ele positivo ou negativo, com a sacarificação do material analisado.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, L.A.B. Cultivo de cana-de-açúcar para produção de cachaça. Viçosa, CPT, 2002. 136p.

ANTEROLA, A.M.; LEWIS, N.G. Trends in lignin modification: a comprehensive analysis of the effects of genetic manipulations/mutations on lignification and vascular integrity. **Phytochemistry** 61:221-294. 2002

BARBOSA, M.H.P.; RESENDE, M.D.; SILVEIRA, L.C.I.; PETERNELLI, L.A. Estratégias de melhoramento genético da cana-de-açúcar em universidades. In: **IX Simpósio sobre seleção recorrente**. Lavras: UFLA, ago. 2005.

BARBOSA, M.H.P.; SILVEIRA, L.C.I. Metodologias de seleção, progressos e mudanças no programa de melhoramento genético da cana-de-açúcar da Universidade Federal de Viçosa, **STAB-Açúcar, Álcool e Subprodutos**. v.18. p.30-32. 2000.

BAUCHER, M.; CHABBERT, B.; PILATE, G.; VANDOORSSELAERE, J.; TOLLIER, M.T.; PETITCONIL, M.; CORNU, D.; MONTIES, B.; VANMONTAGU, M.; INZE, D.; JOUANIN, L.; BOERJAN, W. Red xylem and higher lignin extractability by down-regulating a cinnamyl alcohol dehydrogenase in poplar. **Plant Physiology**, 112:1479-1490. 1996

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

BERLIN, A.; GILKES, N.; KURABI, A.; BURA, R.; TU, M.B.; KILBURN, D.; SADDLER, J. Weak lignin-binding enzymes - A novel approach to improve activity of cellulases for hydrolysis of lignocellulosics. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 121:163-170. 2005

BOERJAN, W.; RALPH, J.; BAUCHER, M. Lignin biosynthesis. **Annual Review of Plant Biology**, 54:519-546. 2003

BOUDET, A.M. A new view of lignification. **Trends Plant Sci.**, 3(2)67-71. 1998

BRADY, J. Some factors influencing lodging in cereals. **Journal Agricultural Science**, v.24, p.209-232, 1934

BRESSIANI, J.A. **Herdabilidade e repetibilidade dos componentes da produção na cultura da cana-de-açúcar**. Piracicaba, SP: ESALQ/USP. 68p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba. 1993.

CANTARELLA, M.; CANTARELLA, L.; GALLIFUOCO, A.; SPERA, A.; ALFANI, F. Effect of inhibitors released during steam-explosion treatment of poplar wood on subsequent enzymatic hydrolysis and SSF. **Biotechnology Progress**, 20:200-206, 2004

CHAPPLE, C., CARPITA, N. Plant cell walls as targets for biotechnology. **Current Op. Plant Biol.**, 1:179-185. 1998.

CHEN, C.L. Lignins: Occurrence in wood tissues isolation reactions, and structure. In: LEWIS, M., GOLDSTEIN, I.S. (ed.). **Wood structure and composition**. N.i. : Marcel Dekker, 1991.

CONAB. Disponível em: www.conab.gov.br. Acesso em: maio 2010

CONAB, 2008. Acompanhamento da Safra Brasileira Cana-de-açúcar, safra 2008, primeiro levantamento, abril/2010, Companhia Nacional de Abastecimento. – Brasília.

COPERSUCAR-Piracicaba-SP. Disponível em: www.copersucar.com.br. Acesso em: maio 2010.

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

CRUZ, C.D.; CARNEIRO, P.C.S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa: UFV, 585p, 2004

CUENYA, M. I; MARIOTTI, J. A. Selection for erectness in sugarcane hybrid progenies. **Sugar Cane**, 3: 1–5. 1984.

DE SOUZA, E. F. M; PETERNELLI, L. A; BARBOSA, M. H. P; Designs and model effects definitions in the initial stage of a plant breeding program. **Pesq. agropec. Bras**, 41(3), 369-375, 2006.

DIXON, R. A; JACKSON, L. A. CHEN, F. NAKASHIMA, J. Improving Saccharification Efficiency of Alfalfa Stems Through Modification of the Terminal Stages of Monoglucosyl Biosynthesis. **Bioenerg. Res.** 1, 180-192, 2008

FALCONER, D.S. **Introduction to quantitative genetics**. 2.ed. New York: Ronald Press. 365p. 1964.

FENGEL, D.; WEGENER, G. Wood, chemistry, ultrastructure, reactions. New York : Waster & Grugter, 613p. 1984.

FERREIRA, A; BARBOSA, M. H. P, CRUZ, C. D; HOFFMANN, H. P
MARCOS ANTONIO SANCHES VIEIRA, M. A. S; BASSINELLO, A. I; SILVA, M.

F Repetibilidade e número de colheitas para seleção de clones de cana-de-açúcar. **Pesq. agropec. bras.** 40(8),761-767, 2005.

FILHO, H.P.M. 120 anos de produção mundial de açúcar: comentários sobre séries estatística tradicionais (1820-1940). **Instituto de Filosofia e Ciências Sociais, UFRJ**, 2003.

HAHLBROCK, K.; SCHEEL, D. Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, 40:347-369. 1989.

HIGUCHI, T - Biochemical Studies of Lignin Formation. **Physiologia Plantarum**, v.10, p. 356-372. 2006

HON, D.N.-S.; SHIRAIISHI, N. Wood and cellulosic chemistry. 2.ed. rev. e aum. **New York: Marcel Dekker**, 914p. 2001.

JORGENSEN, H.; OLSSON, L. Production of cellulases by *Penicillium brasilianum* IBT 20888 - Effect of substrate on hydrolytic performance. **Enzyme and Microbial Technology** 38:381-390. 2006

JUNG, H.G., FAHEY, G.C.. Nutritional implications of phenolic monomers and lignin: A review. **J. Anim. Sci.**, 57(1):206-219. 1983

LAPIERRE, C. Application of new methods for the investigation of lignin structure. In: JUNG, H.G.; BUXTON, D.R.; HATFIELD, R.D. et al. **Forage cell wall structure and digestibility**. Madison: American Society for Agronomy, p.133-163. 1993.

LAPIERRE, C.; POLLET, B.; PETIT-CONIL, M.; PILATE, G.; LEPLE, C.; BOERJAN, W.; JOUANIN, L. (2000) Genetic engineering of poplar lignins: Impact of lignin alteration on kraft pulping performances. **Lignin : Historical, Biological, and Materials Perspectives** 742:145-160

LAPIERRE, C.; POLLET, B.; PETIT-CONIL, M.; TOVAL, G.; ROMERO, J.; PILATE, G.; LEPLE, J.C.; BOERJAN, W.; FERRET, V.; DE NADAI, V.; JOUANIN, L. Structural alterations of lignins in transgenic poplars with depressed cinnamyl alcohol dehydrogenase or caffeic acid O-methyltransferase activity have an opposite impact on the efficiency of industrial kraft pulping. **Plant Physiology** 119:153-163. 1999

LASCANO, O.G.; MARIOTTI, J.A. Estudios de seleccion em la etapa de plantines individuales en cana de azucar (I). Asociaciones fenotipicas entre caracteres em el primer corte. **Revista Industrial y Agrícola de Tucumán**. v.47. n.1. p.35-45, 1970.

LEHNINGER, A.L. et al. **Princípios de bioquímicas**. São Paulo: SARVER. 2000. 839p.

LU, Y.P.; YANG, B.; GREGG, D.; SADDLER, J.N.; MANSFIELD, S.D. Cellulase adsorption and an evaluation of enzyme recycle during hydrolysis of steam-exploded softwood residues. **Applied Biochemistry and Biotechnology** 98:641-654, 2002.

MAPA. Disponível em: www.agricultura.gov.br. Acesso em: maio 2010

MASIERO, G.; LOPES, H. Etanol e biodiesel como recursos energéticos alternativos: perspectivas da América Latina e da Ásia. **Revista Brasileira de Política Internacional**. 51(2); 60-79, 2008.

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

MONTGOMERY, D.C.; PECK, E.A. Introduction to linear regression analysis. New York: John Wiley & Sons, 504p. 1981.

MORAIS, S.A.L. **Contribuição ao estudo químico de Ligninas de *Eucalyptus grandis***. Belo Horizonte, 1987. 175p. Dissertação (Mestrado em Química) - UFMG/ICEx, 1987.

MORAIS, S.A.L. **Contribuição ao estudo químico e espectroscópico da lignina de madeira moída do *Eucalyptus grandis*: Isolamento, quantificação e análise estrutural**. Belo Horizonte, 1992. 260p. Tese (Doutorado em Química) - UFMG/ICEx, 1992.

NEF, (2009). New energy Finance- Disponível em: <<http://bnef.com/>> ; Acesso em julho de 2009

OLIVA, J.M.; NEGRO, M.J.; SÁEZ, F.; BALLESTEROS, I.; MANZANARES, P.; GONZÁLEZ, A.; BALLESTEROS, M. **Effects of acetic acid, furfural and catechol combinations on ethanol**, 2006

PANAGIOTOU, G.; OLSSON, L. Effect of compounds released during pretreatment of wheat straw on microbial growth and enzymatic hydrolysis rates. **Biotechnology and Bioengineering**, 96:250-258, 2007

PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V.T. 2000. Biotechnological potential of agro-industrial residues: sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, 74: 69-80

PAULILLO, L.F.; VIAN, C.E.F.; MELLO, F.T. Álcool combustível e biodiesel no Brasil: quo vadis? RER, Rio de Janeiro, V.45, N.03, 531-565p, jul-set 2007.

PEDROZO, C. A; BARBOSA, M. H. P; RESENDE, M. D.V; PETERNELLI, L. A; COSTA, P. M. A; SILVA, F.L. Eficiência da seleção em fases iniciais do melhoramento da cana-de-açúcar. **Revista Ceres**. 55(1), 01-08. 2008.

PEREZ V. MUÑOZ-DORADO, J.; DE LA RUBIA. In vitro decay of *Aeotaxicon punctatum* and *Fagus sylvatica* woods by white and brown-rot fungi. **Wood Science and Technology**, v.27, p,295-307, 1993.

PÉREZ, J.; MUÑOZ-DORADO, J.; DE LA RUBIA, T.; MARTÍNEZ, J. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: na overview. **Int. Microbiology**,.5,.53-63, 2002.

PILÓ-VELOSO, D., NASCIMENTO, E.A., MORAIS, S.A.L. Isolamento e análise estrutural de ligninas. **Química Nova**, v.16, p.435-448, 1993.

PINTHUS, M. J. Lodging in wheat, barley, and oats: the phenomenon its causes and preventive measures. **Advance in agronomy**. v.25, 209-213, 1973

RALPH, J., HELM, R.F. Lignin/Hydroxycinnamic acid/Polysaccharide complexes: synthetic models for regiochemical. In: JUNG, H.G., BUXTON, D.R., HATFIELD, R.D. *et al.* **Forage cell wall structure and digestibility**. Madison : American Society of Agronomy, p.201-241. 1993

RBB (2007) - Rede Baiana de Biocombustíveis. Disponível em: <<http://www.rbb.ba.gov.br/index.php?menu=biblioteca>> ; Acesso em 12 jan. 2008

RESENDE, M.D.V. **Análise estatística de modelos mistos via REML/BLUP na experimentação em melhoramento de plantas perenes**. Colombo: Embrapa Florestas. Documentos 47. 101 p. 2000.

RESENDE, M.D.V. **Genética biométrica e estatística no melhoramento de plantas perenes**, Brasília: Embrapa Informação Tecnológica. 975p. 2002b.

RESENDE, M.D.V. **Software Selegen-REML/BLUP**. Embrapa Floresta, Curitiba, 67p. (Documentos 77). 2002a.

RIDESA. Disponível em: www.ridesa.org.br. Acesso em: maio 2010

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

ROCHA, A.B. **Características de genótipos de aveia e de trigo e suas relações com a quebra de colmos**. 1996. 126f. Dissertação (Mestrado Agronomia) - Faculdade de Agronomia Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

SALIBA, E.O.S.; RODRIGUEZ, N.M.; GONÇALVES, L.C.; et al. Caracterização microscópica da lignina dos resíduos agrícolas de milho e de soja submetidos à fermentação ruminal e seus efeitos sobre a digestibilidade da fibra. **Arq Bras Med Vet Zootec**, v.51, n.1, p.89-96, 1999^a

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

SANTOS, L.O.M.; OMETTO, A.R.. Ganhos potenciais de cogeração e de créditos de carbono através da palha da cana: uma perspectiva para indústria sucroalcooleira. **Alcoolbrás** – n.113, 64-70p, 2008.

SARKANEN, K. V, LUDWIG, C. H, ed. Lignins: Occurrence, Formation, Structure, and Reactions. **New York: Wiley- Intersci**. 916 pp. 1971

SAXENA, I. M; BROWN R. M. Cellulose synthases and related enzymes. **Current Opinion in Plant Biology**, 3, 523-531. 2000

SHARMA, M.L.; SINGH, P. Selection effect of heritability and association in sugarcane (*Saccharum officinarum*) of important traits. **Indian Journal Agricultural Sciences**. v.68. n.7. p. 355-357. 1998

SIBOUT, R.; BAUCHER, M.; GATINEAU, M.; VAN DOORSSELAERE, J.; MILA, I.; POLLET, B.; MABA, B.; PILATE, G.; LAPIEFFE, C.; BOERJAN, W.; JOUANIN, L. Expression of a poplar cDNA encoding a ferulate-5-hydroxylase/coniferaldehyde 5-hydroxylase increases S lignin deposition in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiology and Biochemistry** 40:1087-1096, 2002.

SILVA, S.A.; CARVALHO, F.I.F. de; NEDEL, J.L.; CRUZ, P.J.; SILVA, J.A.G. da; CAETANO, V. da R.; HARTWIG, I.; SOUSA, C. da S. Análise de trilha para os componentes de rendimento de grãos em trigo. **Bragantia**, v.64, p.191-196, 2005.

SINGH, H.N.; SINGH, S.B.; SINGH, T.K. Selection parameters in sugarcane. **Indian Journal Agricultural Sciences**. v.51. n.8. p. 562-566. 1981.

SKINNER, J.C.; HOGARTH, D.M.; WU, K.K. Selection methods, criteria, and indices. In: HEINZ, D.J. (ed.). **Sugarcane improvement through breeding**. Amsterdam: Elsevier. P.409-453. 1987.

TAIZ, L.; ZEIGER, E.. Plant Physiology. 2nd edition. Sinauer Associates Inc., Publ. 792p, 1998

TAMAGNONE, L.; MERIDA, A.; PARR, A.; MACKAY, S.; CULIANEZ-MACIA, F.A.; ROBERTS, K.; MARTIN, C. The AmMYB308 and AmMYB330 transcription factors from *antirrhinum* regulate phenylpropanoid and lignin biosynthesis in transgenic tobacco. **Plant Cell**, 10:135-154, 1998.

TRIPATHI, S.C. Growth and morphology of spring wheat (*Triticum aestivum* L) culms and their association with lodging: effects of genotypes, N levels and ethephon. **Field Crops Research**, 84(3), 271-290, 2003

UDOP. Disponível em: www.udop.com.br. Acesso em: abril 2010

VAN SOEST, P.J.. Nutritional Ecology of the Ruminant. 2nd edition. *Cornell University Press*. 476p, 1994.

VENCOVSKY, R.; BARRIGA, P. Genética biométrica no fitomelhoramento. Ribeirão Preto: **Sociedade Brasileira de Genética**, 1992. 496p.

WRIGTH, S. The theory of path coefficients – a replay to Nilles' criticism. *Genetics*, Austin, v.8, p.239-255. 1923.

ZHU, L. JAIN, K. B. L; SNIGH, J.B. Anatomical and chemical features of high-yield wheat cultivar with reference to its parents. **Acta Botanica Sinica**. 46(5), 565-572, 2004