



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA E BIODIVERSIDADE**

**GERMINAÇÃO DE CARIOPSES E IDENTIFICAÇÃO DE HÍBRIDOS EM
CRUZAMENTOS DE CANA-DE-AÇÚCAR**

MARIA LÍCIA FONSECA RIBEIRO

2015



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA E BIODIVERSIDADE**

MARIA LÍCIA FONSECA RIBEIRO

**GERMINAÇÃO DE CARIOPSES E IDENTIFICAÇÃO DE HÍBRIDOS EM
CRUZAMENTOS DE CANA-DE-AÇÚCAR**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Sergipe, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agricultura e Biodiversidade, área de concentração em Agricultura e Biodiversidade, para obtenção do título de “Mestre em Ciências”.

Orientadora
Prof.^a Dr.^a Renata Silva-Mann

SÃO CRISTÓVÃO
SERGIPE – BRASIL
2015

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**

R484g Ribeiro, Maria Lícia Fonseca
 Germinação de cariopses e identificação de híbridos em cruzamentos de
 cana-de-açúcar / Maria Lícia Fonseca Ribeiro; orientadora Renata Silva-Mann
 - São Cristóvão, 2015.
 84 f. : il.

 Dissertação (mestrado em Agricultura e Biodiversidade) – Universidade
 Federal de Sergipe, 2015.

 1. Gramínea. 2. Sementes. 3. Cana-de-açúcar – Melhoramento genético. 4.
 Cultivos agrícolas. I. Orientadora Silva-Mann, Renata. II. Germinação de cariopses
 e identificação de híbridos em cruzamentos de cana-de-açúcar.

CDU 633.61:582.542.11

MARIA LÍCIA FONSECA RIBEIRO

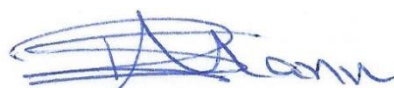
**GERMINAÇÃO DE CARIOPSES E IDENTIFICAÇÃO DE HÍBRIDOS EM
CRUZAMENTOS DE CANA-DE-AÇÚCAR**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Sergipe, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agricultura e Biodiversidade, área de concentração em Agricultura e Biodiversidade, para obtenção do título de “Mestre em Ciências”.

APROVADA em 26 de Fevereiro de 2015.

Prof.^a Dr.^a Sheila Valéria Álvares Carvalho
UFS

Prof. Dr. João Messias dos Santos
UFAL



Prof.^a Dr.^a Renata Silva-Mann
UFS
(Orientadora)

SÃO CRISTÓVÃO
SERGIPE – BRASIL

Aos amados da minha vida

Ao meu noivo, Dênis Correia por sempre me incentivar nesta caminhada.

OFEREÇO

*Aos meus pais, José Jacó Ribeiro e Maria Andrade Fonseca,
por sempre estarem presentes em minha vida me apoiando e
dando-me forças.*

*Aos meus queridos irmãos,
Maria Priscila e Jacó Junior pelo amor e
apoio que têm sempre demonstrado.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Deus, por tornar este sonho possível e por sempre me dar forças para lutar em prol dos meus objetivos.

Ao Programa de Pós-graduação em Agricultura e Biodiversidade (PPGAGRI), por sempre procurar formar profissionais capacitados às exigências do atual mercado de trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de mestrado.

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Renata Silva-Mann por seu apoio e inspiração no amadurecimento dos meus conhecimentos e conceitos que me levaram à execução desse trabalho.

À pesquisadora Allívia Rouse Carregosa Rabbani com quem aprendi muito, para a execução deste trabalho. À pesquisadora Sheila Valéria Álvares Carvalho pelos ensinamentos, orientação, paciência e contribuição. À Itamara Bomfim Gois, que mesmo distante esteve sempre à disposição para a construção do meu aprendizado na pesquisa, pela amizade e respeito que existe entre nós.

À todos do grupo do GENAPLANT, principalmente aqueles que tornaram os momentos tensos em momentos agradáveis.

À todos os colegas de turma. A Bruna Maria e aos meus outros colegas de mestrado Rafaela Moura e Aléa Dayane (Mestres) pela cumplicidade e carinho em todos os momentos.

Às minhas queridas primas Iana, Ivone, Jamilli, Valéria e Priscila (amada-irmã) pela atenção, carinho, amizade, brincadeiras, enfim tudo de bom (convivência nesses dois anos). Em especial ao meu Pequeno-grande (Roberto) por sempre renovar as minhas energias e alegrar a minha vida.

Enfim, a todos aqueles que participaram direta ou indiretamente dessa conquista, meu muito obrigada!!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	I
LISTA DE TABELAS.....	III
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	IV
RESUMO.....	V
ABSTRACT.....	V
1 INTRODUÇÃO GERAL.....	7
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	9
2.1 Origem, botânica e importância econômica da cana-de- açúcar.....	9
2.2 Melhoramento genético da cana-de-açúcar.....	10
2.3 Germinação e embebição controlada.....	12
2.4 Estratégia de seleção de genótipos e variabilidade genética.....	14
2.5 Marcadores moleculares	15
2.5.1 Marcadores moleculares ISSR.....	16
2.5.2 Marcadores moleculares SSR	17
2.5.2.1 Análise de dados de marcadores SSR em cana-de-açúcar.....	19
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	21
4 ARTIGO 1: GERMINAÇÃO DE CARIOPSES DE CANA-DE-AÇÚCAR INDUZIDA POR EMBEBIÇÃO CONTROLADA.....	27
Resumo.....	27
Abstract.....	28
4.1 Introdução.....	29
4.2 Material e Métodos.....	31
4.2.1 Determinação da curva de embebição.....	31
4.2.2 Embebição controlada.....	31
4.3 Resultados e discussão.....	33
4.3.1 Curva de embebição de cariopses de cana-de-açúcar.....	33
4.3.2 Embebição controlada em cariopses de cana-de-açúcar	34
4.4 Conclusão.....	39
4.5 Referências Bibliográficas.....	40
5 ARTIGO 2: VARIABILIDADE INTRA E INTER GENOTÍPICA EM CRUZAMENTO BIPARENTAIS DE CANA-DE-AÇÚCAR USANDO MARCADORES ISSR.....	43
Resumo.....	43
Abstract.....	44
5.1 Introdução.....	45
5.2 Material e Métodos.....	47
5.2.1 Material vegetal.....	47
5.2.2 Extração de DNA.....	47
5.2.3 Reação de ISSR.....	48
5.2.4 Análise dos dados ISSR.....	48
5.3 Resultados e discussão.....	50
5.4 Conclusão.....	57
5.5 Referências Bibliográficas.....	58
6 ARTIGO 3: IDENTIFICAÇÃO DE HÍBRIDOS EM CRUZAMENTOS BIPARENTAIS DE CANA-DE-AÇÚCAR EMPREGANDO MARCADORES SSR.....	61
Resumo.....	61

Abstract.....	62
6.1 Introdução.....	63
6.2 Material e Métodos.....	65
6.2.1 Material vegetal.....	65
6.2.2 Extração de DNA.....	65
6.2.3 Reação de SSR.....	66
6.2.4 Análise dos dados SSR.....	66
6.3 Resultados e discussão.....	68
6.4 Conclusão.....	73
6.5 Referências Bibliográficas.....	74

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
4.1	Curva de embebição em água de cariopses de cana-de-açúcar (<i>Saccharum</i> spp.), baseada no peso de massa (g) ao longo do tempo (horas). UFS, São Cristóvão, Sergipe, 2015.....	33
4.2	Porcentagem de germinação (a) e o Índice de velocidade de germinação (b) de cariopses de cana-de-açúcar (<i>Saccharum</i> spp.) do cruzamento RB956911 x ? em função do tempo (horas) e da embebição controlada em solução de PEG-6.000 (0,0;-0,6;-0,8 e -1;0 MPa).UFS, São Cristóvão, Sergipe, 2015.....	34
4.3	Porcentagem de germinação (a) e Índice de velocidade de germinação (b) em cariopses de cana-de-açúcar (<i>Saccharum</i> spp.) do cruzamento RB972766 x ? em função do tempo (horas) e da embebição controlada em solução de PEG-6000 (0,0;-0,6;-0,8 e -1;0 MPa).UFS, São Cristóvão, Sergipe, 2015.....	35
4.4	Porcentagem de germinação (a) e índice de velocidade de germinação (b) em cariopses de cana-de-açúcar (<i>Saccharum</i> spp.) do cruzamento RB867515 x ? em função do tempo (horas) e da embebição controlada em solução de PEG-6.000 (0,0;-0,6;-0,8 e -1;0 MPa).UFS, São Cristóvão, Sergipe, 2015.....	36
5.1	Dendrograma de similaridades genéticas intra e inter genótipos de cruzamentos biparentais de cana-de-açúcar (<i>Saccharum</i> spp.) (RB9419XRB99371, RB9364XRB93509 e RB855511XRB92579), definido pelo critério de agrupamento UPGMA, com base no coeficiente de Jaccard, empregando dados de marcadores ISSR.....	52
5.2	Dispersão gráfica pelo método da Análise das Coordenadas Principais considerando os três cruzamentos biparentais de cana-de-açúcar (<i>Saccharum</i> spp.), empregando dados de marcadores ISSR. Cruzamento RB9419XRB99371-(C1); Cruzamento RB9364XRB93509-(C2) e Cruzamento RB855511XRB92579-(C3). Genitor feminino (RB9419) do cruzamento C1 - (GFC1); Genitor masculino (RB99371) do cruzamento C1 - (GFC1); Genitor feminino (RB9364) do cruzamento C2- (GFC2); Genitor masculino (RB93509) do cruzamento C2 - (GFC2); Genitor feminino (RB855511) do cruzamento C3- (GFC3); Genitor masculino (RB92579) do cruzamento C3 - (GFC3); Progenies do cruzamento C1, C2 e C3 - (F1...F16).....	53
5.3	Genealogia dos genitores utilizados nos cruzamentos biparentais de cana-de-açúcar (<i>Saccharum</i> spp.). Fonte: PMGCA; Cacao: https://cacao.com	54

- 6.1 Distribuição para genótipos obtidos de três cruzamentos biparentais de cana-de-açúcar com pares de *primers* SSR (SMCS97CS, SCA06, SCA10, SCB07 e SCC01) classificados como mais informativos ($\Delta K=4$). Progênies e genitores são representados pelas barras verticais coloridas. A cor indica o cruzamento: verde RB9419 X RB99371, amarela RB9364 X RB93509, azul RB855511 X RB92579 e a vermelha outra base genética. Cores diferentes no mesmo indivíduo indicam a porcentagem do genoma compartilhado com cada grupo.....

LISTA DE TABELAS

Tabela	Página
4.1. Resultados médios de percentagem de germinação (% G) e Índice de velocidade de germinação (IVG) de cariopses de cana-de-açúcar submetidas a embebição controlada em diferentes potenciais osmótico (0,0; -0,6; -0,8 e -1,0 MPa).UFS, São Cristóvão, Sergipe, 2015.....	37
5.1 Relação do número de bandas amplificadas para cada <i>primer</i> ISSR em cruzamentos biparentais de cana-de-açúcar (<i>Saccharum</i> spp). Número total de bandas (NTB), Número de bandas polimórficas (NBP) e Conteúdo de informação polimórfica (PIC).....	50
5.2 Esquema de análise de variância molecular (AMOVA).....	55
5.3 Parâmetros de diversidade genética em cruzamentos biparentais de cana-de-açúcar (<i>Saccharum</i> spp) com base nos <i>primers</i> de ISSR. Número de alelos (<i>Na</i>), Número de alelos efetivos (<i>Ne</i>), Heterozigosidade esperada (<i>He</i>); Índice de Shannon (<i>I</i>) e Número de alelos exclusivos (<i>Ae</i>).....	56
6.1 Relação do número de bandas amplificada para cada <i>primer</i> SSR em cruzamentos biparentais de cana-de-açúcar (<i>Saccharum</i> spp). <i>Primers</i> SSR, Motif dos <i>primers</i> , Número total de alelos entre os genótipos (NTA), Número de alelos polimórficos entre os genótipos (NAP), Conteúdo de informação polimórfica (PIC), Heterozigosidade esperada (<i>He</i>) e Intervalo de pares de base dos alelos (<i>pb</i>).....	68
6.2 As cultivares usadas com genitores (feminino e masculino), classificação do sexo de cada uma, número de alelos exclusivos em genitor, número de alelos em comuns, porcentagens de híbridos verdadeiros e contaminantes identificado em cada cruzamento.....	70
6.3 Parâmetros de diversidade genética em cruzamentos biparentais de cana-de-açúcar (<i>Saccharum</i> spp) com base nos <i>primer</i> de SSR. Número de alelos (<i>Na</i>), Número de alelos efetivos (<i>Ne</i>), Índice de Shannon (<i>I</i>) Heterozigosidade esperada (<i>He</i>) e Número de Alelos exclusivos (<i>Ae</i>).....	72

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

B.O.D	Biochemical Oxygen Demand/ Demanda Bioquímica de Oxigênio
CB	Campos Brasil
CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
CTAB	Cetyl Trimethylammonium Bromide/ Brometo de cetil trimetil amônio
CTC	Centro de Tecnologia Canavieira
DNA	Deoxyribonucleic acid/ Ácido desoxirribonucléico
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid/ Ácido etilenodiamino tetra-acético
ESTs	Expressed Sequence Tags/ Etiquetas de Sequências Expressas
g	Gramas
KNO ₃	Nitrato de potássio
h	Horas
IAC	Instituto Agronômico de Campinas
ISSR	Inter Simple Sequence Repeats / Inter Repetições de Sequência Simples
MgSO ₄	Sulfato de magnésio
MPa	Mega Pascal
M	Molar
MG	Miligrama
mL	Mililitros
mM	Milimolar
µg	Microgramas
µL	Microlitro
NBP	Número de bandas polimórficas
NBT	Número de bandas total
Ng	Nanograma
NaCl	Cloreto de sódio
P	Porcentagem de polimorfismo
PCR	Polymerase chain Reaction/ Reação de polymerase em cadeia
PEG	Polietileno glicol
PIC	Conteúdo de informação de polimorfismo
Planalsucar	Programa Nacional de Melhoramento da Cana-de-Açúcar
PMGCA	Programa de Melhoramento Genético da Cana-de-açúcar
PVP	Polivinil pirrolidone
RAPD	Random Amplification of Polymorphic DNA/ Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso
RB	República Brasil
RIDESA	Rede Interuniversitária para Desenvolvimento do Setor Sucroenergético
RPM	Rotação por minuto
SSR	Simple Sequence Repeats/ Sequências Simples Repetidas
TBE	Tris Borato EDTA (tampão)
TE	Tris-EDTA
UFS	Universidade Federal de Sergipe
UPGMA	Unweighted Pair-Group Method Arithmetic Average/ Agrupamento ponderado não pareado baseado na media aritmética
V	Volt

RESUMO

RIBEIRO, Maria Lícia Fonseca. **Germinação de cariopses e identificação de híbridos em cruzamentos de cana-de-açúcar**. São Cristóvão: UFS, 2015. 84p. (Dissertação – Mestrado em Agricultura e Biodiversidade). *

A cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.) é uma cultura de grande influência na economia brasileira, devido à utilização de sua matéria prima para a fabricação de açúcar e etanol, além do seu elevado poder energético e como fonte de energia renovável. Os programas de melhoramento genético têm contribuído para a obtenção de cultivares superiores, no entanto, após os cruzamentos controlados, um dos desafios é a produção de cariopses viáveis para o alcance de clones e verificar a descendência e características herdadas destes, os quais serão selecionados posteriormente. O objetivo geral deste trabalho foi avaliar a influência da embebição controlada na germinação de cariopses; bem como analisar a variabilidade genética intra e inter genotípica por meio de marcadores ISSR e identificar híbridos por meio de marcadores SSR em cruzamentos biparentais de cana-de-açúcar. A germinação das cariopses de cana-de-açúcar submetidas aos tratamentos com polietilenoglicol 6.000 nos potenciais -0,6 e -0,8 MPa foram superiores à testemunha, com isso a embebição controlada das cariopses pode ser utilizada para se obter desempenho germinativo e o estabelecimento de plântulas. Quanto ao uso dos marcadores moleculares, observou-se a variabilidade intra e inter cruzamentos, com maior variância genética inter cruzamentos. Identificou-se, a presença de alelos dos parentais em seus descendentes, sendo possível a utilização de marcadores SSR na identificação de híbridos em cruzamentos biparental.

Palavras-chave: Semente. DNA. Seleção de progênes. Cultivar.

* Comitê Orientador: Prof.^a Dr.^a Renata Silva-Mann– UFS (Orientadora), Prof.^a Dr.^a Sheila Valéria Álvares Carvalho.

ABSTRACT

RIBEIRO, Maria Lícia Fonseca. **Cariopses germination and hybrid identification in sugarcane crosses**. São Cristóvão: UFS, 2015. 84p. (Dissertation – Master in Agriculture and Biodiversity). *

The sugarcane (*Saccharum* spp.) is a crop of great influence in Brazilian economy due the utilization of raw for sugar and alcohol production, besides the elevated energetic potential and as renewable source of energy. The breeding programs have contributed to the achievement of superior cultivars, however, after the crosses; one of the challenges is the production of viable cariopses to achieve clones which will be selected subsequently. Thus, two challenges need further studies, first allow most cariopsis from controlled crossings obtain higher percentage of germination, and secondly prove the hybridization of these crossings. The aim of this study was to evaluate the influence of controlled imbibition on cariopsis germination; and to estimate the genetic diversity through SSR markers and validate the use of ISSR markers in identifying hybrids. The germination of cariopsis of sugarcane submitted to treatment with polyethyleneglycol 6.000 in potential -0.6 and -0.8 MPa were higher than the control, thereby imbibition controlled of the cariopsis can be used to obtain germination performance and seedling establishment. Regarding the use of molecular markers, we observed the presence of the parental alleles in some offspring percentage and genetic variability among crosses; it is possible to use SSR markers in breeding programs for identifying hybrids in biparental crossings.

Key-words: Seed. DNA. Selection of progenies. Cultivar.

* Comitê Orientador: Prof.^a Dr.^a Renata Silva-Mann– UFS (Orientadora), Prof.^a Dr.^a Sheila Valéria Álvares Carvalho.

1 INTRODUÇÃO GERAL

A cana-de-açúcar tornou-se uma das principais culturas do Brasil, fornecendo matéria-prima para a produção de açúcar e etanol, além de apresentar elevado poder energético. O aumento da produção dessa cultura em grande parte dos programas de melhoramento genético, com os quais busca-se atender novas demandas foram responsáveis pela mudança no perfil varietal dos clones atuais por meio de cruzamentos controlados, visando o aumento da variabilidade genética.

Esses programas iniciam as atividades no campo por meio de dois ou mais genótipos, que são cruzados, denominados de cruzamentos biparentais ou múltiplo parentais, e a partir daí obtêm-se as cariopses, as quais apresentam na maioria das vezes germinação baixa e desuniforme, além da perda rápida de viabilidade. Assim, é indispensável a utilização de várias sementes para alcançar um número expressivo na produção de mudas a serem utilizadas nos experimentos em campo, para posteriormente serem submetidas às fases de seleção.

A ocorrência de autofecundação e progênes contaminadas podem ocorrer e afetar a fertilidade do pólen influenciando na germinação em cruzamentos controlados. Dessa forma, reflexos negativos no comportamento das progênes podem acontecer pela perda de vigor e modificação na estrutura genética das famílias, causando sérias implicações na descendência das possíveis cultivares.

Para os programas de melhoramento a identificação de progênes nas fases precoces é fundamental, pois permite uma avaliação correta do comportamento genético e morfológico da família, possivelmente a estimativa da variabilidade genética dos parentais envolvidos no referente cruzamento pode ser melhor explorado, a partir das características de interesse, as quais passam de geração para geração.

Assim, a seleção de clones com características superiores aos seus progenitores, ou seja, com maior variabilidade genética e elevado efeito de heterose, têm sido cada vez mais difícil, quando feita exclusivamente pela seleção fenotípica. Associada a esta seleção, o uso de marcadores moleculares possibilita a identificação de cruzamentos biparentais ou policruzamentos, os quais podem ser conduzidos apenas para os clones de interesse, reduzindo os custos de análise molecular e aumentando a confiabilidade sobre os programas de melhoramento, e, possivelmente, reduzindo o tempo para a obtenção de novas cultivares.

Com a obtenção do material geneticamente melhorado, têm-se plantas com maior produtividade, melhor tolerância às doenças e adaptadas às regiões onde serão cultivadas,

proporcionando o fortalecimento do mercado interno e externo na produção dos derivados da cana-de-açúcar.

Desta forma, o objetivo geral deste trabalho foi avaliar a influência da embebição controlada na germinação de cariopses; bem como analisar a variabilidade genética intra e inter genotípica por meio de marcadores ISSR e identificar híbridos por meio de marcadores SSR em cruzamentos biparentais de cana-de-açúcar.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Origem, botânica e importância econômica da cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar é uma planta originária, provavelmente das regiões da Indonésia e Nova Guiné, adaptando-se a ambientes tropicais e subtropicais. No entanto, alguns autores relatam que o seu centro de origem seja na Ilhas do Arquipélago da Polinésia (CESNIK e MIOCQUE, 2004). Essa espécie é classificada taxonomicamente como da família Poaceae, tribo Andropogoneae e pertence ao gênero *Saccharum* L. As principais espécies são *S. officinarum*, *S. spontaneum*, *S. robustum*, *S. sinense*, *S. barberi* e *S. edule* (SINGH et al., 2005).

Sua reprodução pode ser sexuada, onde acontece mudança do meristema apical, o qual deixa de produzir folhas e colmos e passa a desenvolver inflorescência, chamada de bandeira ou flecha, constituída de flores completas, pequenas e hermafroditas, as quais apresentam diferentes níveis de viabilidade do grão de pólen (MCINTYRE e JACKSON, 2001; ARALDI et al., 2010). O fruto é chamado de cariopse, é seco, e indeiscente, não podendo ser separado da semente, apresentando pericarpo ao redor de todo o tegumento (BRASIL, 2009).

O desenvolvimento desta planta é em forma de touceira, sendo formada por colmos, fragmentado em nó e entre nó, suculento e doce, devido ao armazenamento de sacarose; folhas do tipo lanceoladas com nervuras paralelinérveas, com rizomas e raízes fasciculadas, típicos das monocotiledôneas (CHEAVEGATTI-GIANOTTO et al., 2011).

É uma das culturas mais importantes economicamente para o Brasil, por ser a principal fonte de açúcar e etanol, sendo este último, fonte alternativa e renovável de energia. Além disso, um dos seus co-produtos, o bagaço, tem sido destinado para gerar energia calorífica em unidades termoeletricas e também é usado como suplemento para a engorda do gado (SILVA e FERREIRA, 2009).

Devido a sua importância econômica, a cana-de-açúcar ocupa lugar de destaque na agricultura estando entre as espécies vegetais mais cultivadas em mais de 80 países no mundo (TEIXEIRA, 2006).

O Brasil é o maior produtor da cultura, seguido por Índia e China, como também o maior produtor de açúcar e etanol. Espera-se para a safra de 2014/2015 uma produção de 36,36 milhões de toneladas de açúcar, redução de 4% em relação a 37,88 milhões de toneladas na safra passada. Para a produção de etanol total está estimada em 28,66 bilhões de litros, 2,53% a mais do que os 27,96 bilhões de litros da safra 2013/14 (CONAB, 2014).

O sucesso dessa atividade econômica é decorrente, principalmente, dos programas de melhoramento genético, os quais visam desenvolver cultivares adaptadas às diversas regiões canavieiras e resistentes às principais pragas e doenças, além de melhorar as características industriais das variedades (ROSSE et al., 2002).

2.2 Melhoramento genético da cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar cultivada atualmente é um híbrido multiespecífico, originado a partir da recombinação dos híbridos de duas espécies altamente poliploides, *S. officinarum* ($x = 10$, $2n = 8x = 80$) e *S. spontaneum* ($x = 8$, $2n = 5-16x = 40-128$), recebendo a designação *Saccharum* spp. (SINGH et al., 2005).

Para se obter híbridos o melhoramento genético iniciou em Barbados e Java, aproximadamente no final do século XIX. As primeiras seleções foram entre os cruzamentos da espécie *S. officinarum* que compreende as chamadas canas “nobres”, caracterizadas pelo alto teor de sacarose e colmos grossos, porém pouco teor de fibra, sendo uma das espécies base dos programas de melhoramento (MING et al., 1998). E a *S. spontaneum*, está apresenta baixo teor de sacarose e colmos curtos e finos, mas se destaca com alto teor de fibra e apresenta resistência a condições adversas, oferecendo grande contribuição ao melhoramento (SILVA, 1993).

Esse processo de promover o cruzamento de um clone “nobre”, rico em açúcar, com um clone de uma espécie geneticamente próxima que apresentasse alguma vantagem como, por exemplo, a resistência, ficou conhecida como “nobilização”, que tinha como objetivo obter novas cultivares que possuíam potencial de produção de açúcar das canas “nobres” e o vigor e resistência de *S. spontaneum* (MING et al., 2006).

Em razão da origem desse cruzamento interespecífico entre *S. officinarum* e *S. spontaneum*, para se chegar as cultivares modernas ocorreu variação no número de cromossomos ($2n=8x-10x=100-130$), o genoma sofreu sucessivas duplicações, apresentando poliploidia e aneuploidia que complica o entendimento da sua arquitetura genética (PIPERIDIS et al., 2010). A maioria das plantas cultivadas, provavelmente não excede a complexidade do genoma da cana-de-açúcar, o que vem dificultando o entendimento da sua genética e a aplicação de ferramentas biotecnológicas no melhoramento da cultura (D'HONT, 2005).

Para efetuar esses processos e melhorar o desempenho genético dessa cultura, foram criados programas de melhoramento genético de cana-de-açúcar em diferentes países, por instituições públicas e privadas com participação ativa do setor produtivo. Para criar um

empreendimento deste é necessário investimento, e os resultados são obtidos em longo prazo, chegando a mais de quinze anos (CESNIK e MIOCQUE, 2004). No entanto, com os avanços da tecnologia no melhoramento genético é possível obter clones em até 10 anos, diminuindo os investimentos para lançar uma nova cultivar (RIDESA-BRASIL, 2010).

No final do século XIX foram registradas em canaviais brasileiros algumas doenças que nas safras posteriores provocaram uma redução na produtividade e, por conseguinte, na produção de açúcar e álcool. Diante deste cenário iniciaram os programas de melhoramento de cana-de-açúcar com a finalidade de produzir cultivares resistente a pragas e doenças, as primeiras canas foram desenvolvidas a partir da década de 30 pelo Instituto Agrônomo de Campinas – IAC em São Paulo e Campos Brasil- CB no Rio de Janeiro (ANDRADE, 1985).

Na década de 60, foi criado o Programa de Melhoramento Coopersucar-SP, atual Centro de Tecnologia Canavieira – CTC, e na década de 70 o Planalsucar - RB que foi extinto em 90, sendo designada a Rede Interuniversitária para Desenvolvimento do Setor Sucroalcooleiro-RIDESA, e em 2003 foi criado o programa de melhoramento CanaVialis (MATSUOKA et al., 2005; PMGCA, 2009). Atualmente, a Rede Interuniversitária para Desenvolvimento do Setor Sucroenergético - RIDESA se destaca diante dos demais programas de melhoramento, desenvolvendo cultivares altamente produtivas, o que vem garantido à produção brasileira, esforço conjunto de dez universidades federais brasileiras. Esses programas apresentam grandes diferenças na condução de suas atividades, mas há alguns pontos em comum, como: a seleção e clonagem de genótipos superiores dentro de populações segregantes, que são obtidas por meio de cruzamentos entre indivíduos (MATSUOKA et al., 2005).

Os cruzamentos são uma estratégia utilizada pelos programas de melhoramento para obter variabilidade genética e, conseqüentemente, novas variedades. Esses podem ser cruzamentos múltiplo parental, que consistem em reunir vários genitores para que eles se intercruzam e cruzamentos biparentais, em que o genitor masculino e feminino é conhecido (HEINZ e TEW, 1987). A classificação dos genitores pode ser feminino, masculino ou intermediário, isto é de maneira subjetiva com base na viabilidade polínica determinada por métodos de coloração dos grãos de pólen, e as classes sexuais variam de acordo com taxas determinadas pelos programas de melhoramento (MCINTYRE e JACKSON, 2001).

Nesses cruzamentos envolvendo parental feminino que produz pólen viável é possível a ocorrência de autofecundação, podendo ocorrer depressão por endogamia e afetar de maneira geral a fertilidade do pólen, germinação de sementes e componentes de produção. Indivíduos endogâmicos tendem a apresentar baixa germinação de sementes, menor altura, peso e diâmetro de colmos em comparação com indivíduos resultantes de fecundação cruzada (MACHADO et al., 1996; FERREIRA et al., 2005; SILVA e GONÇALVES, 2011).

O programa de melhoramento genético da cana-de-açúcar da RIDESA inicia com a hibridação de genitores selecionados, apresentando divergência genética, capacidade de combinação e associação de caracteres de importância agroindustrial (BARBOSA, 2001). Esses cruzamentos ocorrem em duas unidades experimentais, Estação de Floração e Cruzamentos da Serra do Ouro, no Estado de Alagoas e na Estação de Floração e Cruzamento de Devaneio no Estado de Pernambuco (RIDESA-BRASIL, 2010).

Após obter as cariopses, as Universidades que compõem a RIDESA recebem os lotes, em seguida os experimentos são estabelecidos por meio da semeadura destas e as plântulas (*seedlings*) obtidas são distribuídas em campo, passando por várias fases denominadas; T1 (Primeira Fase de Seleção), T2 (Segunda Fase de Seleção), T3 (Terceira Fase de Seleção), FM (Fase de Multiplicação), FE (Fase de Experimentação), CV (Curva de Maturação) e TD (Teste de Doença). Uma vez em campo, as plantas têm seu desenvolvimento avaliado, sendo inicialmente um número grande de genótipos e após vários critérios de seleção, têm-se genótipos com alto potencial para registrar, de acordo com as normas de cultivares comerciais (PMGCA, 2009). Na realidade, o programa de melhoramento baseia-se na seleção e clonagem de genótipos superiores presentes em populações segregantes.

Os programas de melhoramento genético aumentam os interesses agrônômicos (material geneticamente tolerante a doenças, pragas, produtividade, dentre outras vantagens) que contribuem para a viabilidade econômica dessa cultura, tornando o país mais competitivo em relação ao mercado externo e independente da importação de tecnologia (LAKSHMANAN et al., 2005).

2.3 Germinação e embebição controlada

O processo de germinação inicia-se com a absorção de água por embebição, porém, a semente tem necessidade de alcançar um nível adequado de hidratação para ocorrer uma série de mudanças fisiológicas e bioquímicas no embrião (BRAGA et al., 2009). A velocidade dessa absorção varia para cada espécie, sendo condicionada, pela disponibilidade de água, que pode variar desde a saturação até próximo de zero e pela pressão hidrostática. A disponibilidade e a velocidade do fluxo de água para a semente é determinada pela diferença de potencial hídrico entre a superfície da semente e o substrato (BITTENCOURT et al., 2004; LOPES e MACEDO, 2008). Uma embebição prolongada, sob baixos potenciais hídricos, tem influência na velocidade, uniformidade e porcentagem de germinação das sementes (BEWLEY e BLACK, 1994). Com isso, várias técnicas de hidratação de sementes têm sido desenvolvidas para aumentar a emergência das plântulas (KHAN, 1992).

Uma dessas técnicas tem sido a restrição hídrica, que proporciona condições para simulação de déficit hídrico de maneira rápida e segura (MACHADO et al., 2012). Em algumas situações, a restrição hídrica pode funcionar como embebição controlada, que consiste na submersão das sementes em solução osmótica, permitindo a hidratação até que os potenciais hídricos das sementes e da solução fiquem em equilíbrio, onde inicia a ativação dos processos metabólicos das fases iniciais da germinação. A partir deste processo é possível acelerar e uniformizar a germinação, assim como simular o estresse hídrico (BITIENCOURT et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2010).

Estas técnicas baseiam-se no princípio de controle do processo de germinação, por meio da adição de solutos a substratos para permitir a embebição das sementes e o desenvolvimento das etapas I e II do processo de germinação, que são preparatórias para a germinação, sem chegar à fase III, caracterizada pelo alongamento celular e emissão de radícula (NASCIMENTO, 2004; SANTOS et al., 2008), pois o padrão de germinação de sementes é trifásico. Na fase I denominada embebição passiva, ocorre à absorção de água pela semente, sendo um processo rápido devido à diferença de potencial matricial dos diversos tecidos que as compõem. Esta etapa ocorre em sementes viáveis, mortas ou dormentes. Na fase II conhecida como estacionária, a semente absorve pouca água, no entanto, ocorre transporte ativo do tecido de reserva para o tecido meristemático, visto que o potencial osmótico e o potencial de pressão são semelhantes. E a fase III caracteriza-se pela retomada de absorção de água e protrusão da radícula. A germinação é caracterizada como um processo irreversível, sendo um dos estados mais delicados durante o ciclo de vida da planta (BEWLEY e BLACK, 1994).

Com o controle da embebição, é possível submeter as sementes empregando substratos, proporcionando condições de déficit hídrico (MACHADO et al., 2012). Para isso podem ser utilizadas soluções inorgânicas ou orgânicas que controlam a velocidade de embebição de água das sementes, ajustando os potenciais hídricos que permitem a ocorrência desses processos fisiológicos iniciais (BRADFORD, 1986). As soluções inorgânicas que podem ser utilizadas para o osmocondicionamento são: cloreto de sódio (NaCl), nitrato de potássio (KNO₃) e sulfato de magnésio (MgSO₄); e as orgânicas o manitol, glicerol e polietilenoglicol (PEG) que é encontrado com o peso molecular (4.000, 6.000, 8.000 e 12.000), sendo o 6.000 mais utilizado. Estas substâncias químicas são osmoticamente ativas como forma de controlar a entrada de água na semente, e têm sido amplamente estudadas (HAIGH et al., 1986; NASCIMENTO, 2004).

Em pesquisas com sementes de sorgo (cultivar IPA 1011), observou-se que o envelhecimento artificial afeta negativamente o desempenho das sementes, o qual foi

parcialmente revertido pelo condicionamento osmótico. Estas sementes foram submetidas a solução de PEG 6.000 no potencial osmótico de $-0,86$ MPa a 15°C por 48 horas, onde promoveu benefícios no vigor das sementes e na qualidade fisiológica, sendo superior a testemunha (OLIVEIRA e GOMES-FILHO, 2010).

Sementes de *Brachiaria brizantha* (Poaceae), quando condicionadas em soluções osmóticas de PEG 6.000 por um período de 12 horas, no potencial osmótico de $-0,9$ MPa, contribuiu para o aumento do índice de velocidade de protrusão radicular das sementes em relação à testemunha (BONOME et al., 2006).

Com sementes de milho que foram imersas em solução de PEG 6.000 (0,0; $-0,4$; $-0,8$ e $-1,0$ MPa) durante 15 h a 10°C em condições de escuro, o melhor tratamento que aumentou a percentagem de germinação foi o condicionamento em água em comparação com as sementes não condicionadas (AGHBOLAGHI e SEDGHI, 2014).

Segundo Peske e Novembre (2010) o condicionamento fisiológico nas sementes de milho, utilizando água ou PEG 6.000, não interfere no desenvolvimento inicial das plântulas. Para este trabalho foram avaliados três lotes de sementes de milho da cultivar BRS 1501, sendo condicionadas em potenciais de solução de PEG 6.000 e testemunha, observou-se que a emissão da raiz primária ocorre com 33% de água e para os potenciais de $-1,2$ e $-1,4$ MPa as sementes não absorveram mais do que 28% de água, assim, não emitiram a raiz primária.

O condicionamento fisiológico é uma técnica de embebição controlada, a qual tem sido aplicada em sementes pequenas e de alto valor agregado, como algumas espécies de hortaliças e de Poaceae. Por ser uma alternativa viável para favorecer o desempenho de sementes em campo, e principalmente promover a uniformidade e reduzir a velocidade de germinação (BAJEHBAJ, 2010).

2.4 Estratégia de seleção de genótipos e variabilidade genética

Em cana-de-açúcar, a seleção é praticada em todas as fases do melhoramento genético, desde a escolha dos genitores, escolha do tipo de cruzamento, seleção de indivíduos dentro de família e nas etapas seguintes com a seleção clonal (CALIJA et al., 2001).

Muitos melhoristas têm escolhido seleção de indivíduos dentro de famílias superiores, por conta da disponibilidade da variância genética aditiva, que fica disponível entre plantas, proporcionando ganhos adicionais que são obtidos mediante a seleção das melhores plantas das parcelas, representadas por famílias superiores (CORNACCHIA et al., 1995).

Nessa seleção individual, as plantas são selecionadas com base em seus valores fenotípicos, pois nesta fase não há repetição dos genótipos avaliados. É considerada uma técnica que possibilita uma reposta rápida, principalmente em famílias com maior variabilidade genética (FALCONER e MACKAY, 1996).

A variabilidade genética disponível para seleção provém de cruzamentos sexuais realizados entre genitores divergentes e com bons caracteres agronômicos e resistentes às principais doenças, isso é conseguido pelo uso de variedades comerciais ou pré-comerciais por apresentarem um conjunto de genes de interesse (SOUZA, 1995; CRUZ et al., 2004). A importância de identificar os genitores mais divergentes geneticamente, para que ocorra a formação de famílias com maior variabilidade genética, pode possibilitar a obtenção de clones elites em fases avançadas de seleção do programa de melhoramento (KIMBENG e COX, 2003).

No entanto, a eficiência do melhoramento de uma espécie vegetal irá depender da divergência genética existente entre os genitores, da herdabilidade, do caráter a ser melhorado e da extensão do ganho genético deste caráter selecionado, estes são apropriados para produzir alto efeito heterótico e maior variabilidade genética das populações segregantes (BRESSIANI, 2002).

2.5 Marcadores moleculares

As pesquisas de melhoramento com base em marcadores moleculares em cana-de-açúcar apresentam indícios de seu desenvolvimento desde os anos 80, quando geneticistas e produtores passaram a estudar vários tipos de marcadores de DNA e sua utilidade no melhoramento, possibilitando uma maior compreensão da composição genética desta espécie (PAN, 2006).

Os marcadores moleculares de DNA são sequências genômicas que diferenciam dois ou mais indivíduos que são herdadas geneticamente. Os distintos tipos de marcadores moleculares, hoje disponíveis, diferenciam-se pela tecnologia utilizada para revelar variabilidade em nível de DNA e, assim, variam quanto à habilidade de detectar diferenças entre indivíduos, custo, facilidade de uso e coerência dos dados apresentados (MUNIZ et al., 2002).

O uso desses marcadores de DNA para análise genética e manipulação das características de importância agronômica torna-se uma ferramenta cada vez mais útil no melhoramento de plantas, por apresentar um ótimo desempenho nos programas de melhoramento, desde as impressões digitais (*fingerprinting*) de cultivares elite, estoques

genéticos, avaliação de diversidade genética, e também podem auxiliar na eficiência da seleção para características específicas (ZHANG et al., 2004). Estes marcadores são robustos, rápidos e as informações podem ser obtidas com pequenas quantidades de material vegetal em qualquer fase de desenvolvimento, e não são afetados por condições ambientais (SRIVASTAVA e GUPTA, 2008).

Como apoio ao método clássico de melhoramento genético de cana-de-açúcar, pode se fazer uso dessas ferramentas moleculares para auxiliar nos estudos genéticos, como a identificação de parentais e também a diversidade genética, entre outras (BERTRAND e MACKILL, 2008).

2.5.1 Marcadores moleculares ISSR

Os marcadores moleculares ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat* – Inter Repetições de Sequência Simples) não requerem informações específicas de sequências de DNA da espécie a ser estudada, utilizam *primers* com tamanho de 16 a 25 pares de bases, contendo sequências de dois ou três nucleotídeos, tem se destacado como uma alternativa eficiente para caracterização de genomas complexos (WOLFE, 2005).

O método de ISSR possibilita a determinação da diversidade inter e intra específica, exploram regiões do genoma altamente repetido, produzem fragmentos com alta reprodutibilidade, geram altos índices de polimorfismo, obtendo-se resultados confiáveis, devido a sua abundância e dispersão no genoma, eficiente e com custos razoavelmente menores em comparação aos outros marcadores (REDDY et al., 2002).

Este tem sido utilizado para estudar a divergência genética entre indivíduos, no intuito de identificar e determinar relações ao nível de espécies e cultivares (ALMEIDA et al., 2009). A segregação dos marcadores é dependente de polimorfismo, portanto, quanto mais alto o grau de polimorfismo dos marcadores moleculares melhor a sua eficiência (HOFFMAN & BARROSO, 2006).

O alto nível de polimorfismo foi detectado em cultivares de cana-de-açúcar com o ISSR e facilitou o desenvolvimento de *fingerprinting* de DNA (ALMEIDA et al., 2009). Em estudo de 138 famílias de irmãos completos de Milho (*Zea mays* L.) por meio de 23 *primers* ISSR observou-se 78,80% de polimorfismo, sendo uma ferramenta útil na avaliação de diversidade genética (CUNHA et al., 2012).

A diversidade genética foi caracterizada entre nove variedades de cana-de-açúcar cultivadas em diferentes regiões, incluindo material resistente à seca selecionado da região Nordeste do Brasil e de duas variedades da Índia como genótipos contrastantes, utilizando

doze *primers* ISSR. Com isso variedades tolerantes à seca e suscetíveis foram claramente separadas, mostrando a eficiência desse marcador (COSTA et al., 2011).

A ferramenta ISSR foi utilizada para avaliar a diversidade genética e as inclusões de trinta e três acessos de trigo-de-perdiz da espécie *Aegilops* do Noroeste do Irã, que pertence à mesma família da cana-de-açúcar. Utilizou onze *primers* de ISSR que produziram 171 fragmentos polimórficos. Por meio destes marcadores foi possível detectar diversidade genética nas espécies de *Aegilops* do Noroeste do Irã, que podem ser úteis em bancos de germoplasma para o melhoramento genético, especialmente a diversidade genética intraespecífica (BARANDUZI et al., 2013).

Em programas de melhoramento vegetal esses marcadores de DNA podem contribuir para seleção de genótipos a serem utilizados futuramente como genitores de novas cultivares, pois apresentam-se entre os mais utilizados atualmente para várias espécies de plantas (GONÇALVES-VIDIGAL e RUBIANO, 2011).

2.5.2 Marcadores moleculares SSR

A técnica de microssatélites ou SSR (*Single Sequence Repeats* – Sequências Simples Repetidas) são sequências de dois a seis pares de bases repetidas, os alelos diferem porque ocorrem em números distintos de repetições em *tandem* – sequência de DNA que se repete, por exemplo, AACT-(AACTAACTAACT...), oriundos de recombinação desigual na meiose ou no deslizamento da DNA polimerase durante a duplicação da molécula (POKHRIYAL et al., 2012).

Estes marcadores são eficientemente analisados por PCR (*Polimerase Chain Reaction* – Reação em Cadeia da Polimerase), a amplificação do DNA genômico total utilizando dois *primers* únicos compostos de sequências curtas de nucleotídeos que flanqueiam e definem o loco de microssatélite. Os produtos da amplificação obtidos de diferentes indivíduos podem ser separados em géis de agarose ou poliacrilamida (POWELL et al., 1996). Além de possuírem a natureza multialélica, herança codominante, altamente polimórficos, utilizam *primers* específicos que amplificam regiões com DNA repetitivo (OLIVEIRA et al., 2006).

A presença de microssatélites em sequências codantes tem permitido o desenvolvimento de SSRs (SSR funcionais), a partir disso busca-se SSR em EST (*Expressed Sequence Tags* - Etiqueta de Sequência Expressa), os quais amplificam regiões conservadas do genoma, portanto, perfeita para a análise do polimorfismo das regiões transcritas de genomas grandes e complexos, a exemplo da cana-de-açúcar (GARSMEURR et al., 2011).

Os marcadores derivados de ESTs oferecem oportunidades para a descoberta de genes, permitindo à análise da região transcrita do genoma facilitando a discriminação de sequências alvos como locos gênico de ligação, referente às características de interesse agrônomo, principalmente em plantas poliploides (UKOSKIT et al., 2012).

O uso desses marcadores moleculares na estimativa da divergência genética e na seleção de genitores com caracteres desejáveis é uma estratégia amplamente utilizada em programas de melhoramento genético. Dutra Filho et al. (2013) utilizaram a técnica de EST SRR para estimar a diversidade genética entre três populações (progênes) autofecundadas, com três variedades comerciais de cana-de-açúcar, observaram uma dissimilaridade entre os clones e variedades de 22 a 77%, sendo que os genótipos mais distantes geneticamente foram recomendados para hibridização.

Essa técnica foi utilizada para acessar informações de parentesco genético entre trinta e cinco cultivares de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp. híbridos) e cinco clones de espécies selvagens. Entre estes materiais o índice de diversidade variou de 71 a 91% e a similaridade genética entre as cultivares com os clones domesticados de *S. officinarum* L. (Badila) e a *S. spontaneum* L. (Dacca) espécie selvagem apresentaram mais de 73%. Observou-se a presença de alelos sendo transmitida aos seus descendentes ao longo das gerações (CHEN et al., 2009).

Santos et al. (2014) avaliaram a paternidade de setenta e seis progênes de quatro cruzamentos biparentais de cana-de-açúcar. Com três marcadores moleculares SSR, identificaram de 20 a 100% de híbridos verdadeiros e uma variação de 15,79 a 80% para progênes oriundas de contaminação em cada cruzamento. Por outro lado, Tew e Pan (2010) encontraram taxas de 0 a 45 % de autofecundação por meio de sete pares de *primers* SSR, em 87 progênes de sete cruzamentos múltiplo parentais.

Xavier et al. (2014) também avaliaram a identificação do progenitores masculinos de quarenta e um clones provenientes de cruzamento múltiplo parental, e foi possível identificar a paternidade de 73% dos clones avaliados, possibilitando novas combinações genéticas com esses materiais, ou seja, não ocorre perda de informação genética.

Esta ferramenta tem sido muito útil nos programas de melhoramento, avaliando a variabilidade genética presente em bancos de germoplasma, permite ainda orientar os cruzamentos entre cultivares, reconhecer caracteres geneticamente específicos de uma espécie e determinar a identidade do indivíduo e a relação de parentesco (PARIDA et al., 2009; TABASUM et al., 2010).

2.5.2.1 Análise de dados de marcadores SSR em cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar cultivada atualmente tem um genoma de natureza complexa por apresentar alta poliploidia e ocorrência simultaneamente de aneuploidia, ou seja, a poliploidia é a existência de mais de dois cromossomos dentro de uma mesma classe de homologia; se o número total de cromossomos não é múltiplo do número base de cromossomos da espécie, a planta é aneuplóide, é o caso da cana-de-açúcar (ALLARD, 1971). Em virtude disso, pode proporcionar alterações na arquitetura celular e nos processos regulatórios, com dificuldades na meiose (COMAI, 2005).

Assim, torna-se difícil determinar a posição em que um alelo está presente no genoma, conseqüentemente, na maioria das vezes existem dificuldades em diferenciar os alelos de cromossomas homólogos, dificultando a visualização entre o heterozigoto em que os alelos que estão presentes em um loco são diferentes ou o homozigoto quando o mesmo possui os alelos iguais, tanto o alelo materno como paterno que juntos representam um loco (CORDEIRO et al., 2003, OLIVEIRA et al. 2009).

Devido a essas questões presentes no genoma da cana-de-açúcar, trabalhos utilizando os marcadores SSR, considerados co-dominantes, e em organismos diplóides, cada loco avaliado pode diferenciar entre indivíduos homozigóticos e heterozigóticos. No entanto, em organismos poliplóides como a cana-de-açúcar, apesar deste tipo de marcador revelar todos os diferentes tipos de alelos presentes no loco, não é possível identificar o número de alelo que se encontra presente. Isto faz com que este marcador seja genotipado com base na presença e ausência de fragmentos (alelos) da mesma forma que um marcador dominante formando um sistema binário (CORDEIRO et al., 2003).

Os marcadores SSR têm apresentado resultados satisfatórios em trabalhos de melhoramento genético de cana-de-açúcar. You et al. (2013) analisaram os resultados de marcadores SSR em forma de dados binários para estimar a diversidade genética entre 115 genótipos de cana-de-açúcar com cinco marcadores, obtiveram 88 alelos polimórficos (100%), e a diversidade genética encontrada foi de 90,5%. Os marcadores EST's SSR também foram utilizados, visando avaliar a variabilidade genética entre e dentro de progênies elites de cana-de-açúcar, bem como estimar a divergência genética entre três variedades comerciais e 20 clones oriundos de autofecundação. Amplificaram um total de 38 alelos, dos quais 34 foram polimórficos (89,47%) e quatro foram monomórficos (10,53%), obtendo resultados para a seleção de clones superiores (DUTRA FILHO et al., 2013).

Ao considerar os marcadores SSR como dominantes, estes não perdem a sua precisão, mesmo assim técnicas de biotecnologia tendem a avançar, e espera-se alcançar mais

conhecimento dos mecanismos meióticos destas plantas, que apresentam a poliploidia, e assim determinar o comportamento dos cromossomos, suas associações e tipos de segregação, e usar essas informações para compreender o genoma destas culturas (D'HONT, 2005).

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGHBOLAGHI, M. A.; SEDGHI, M. The effect of osmo and hormone priming on germination and seed reserve utilization of millet seeds under drought stress. **Journal of Stress Physiology & Biochemistry**, v. 10, n. 1, p. 214-221, 2014.

ALLARD, R.W. (1971). **Princípios do melhoramento genético em plantas**. São Paulo: Ed. Blucher, 381p.

ALMEIDA, C. M. A. de; LIMA, S. E. N. de; LIMA, G. S. A.; BRITO, J. Z. ; DONATO, V. M. T. S.; SILVA, M. V. Caracterização molecular de cultivares de cana-de-açúcar utilizando marcadores ISSR. **Ciência agrotécnica**, v. 33, Edição Especial, p. 1771 – 1776, 2009.

ANDRADE, J. C. **Escorço histórico de antigas variedades de cana-de-açúcar**. Maceió: Associação dos plantadores de cana de Alagoas, 1985.

ARALDI, R.; SILVA, F. M. L.; ORIKA ONO, E.; RODRIGUES, J. D. Florescimento em cana-de-açúcar. **Ciência Rural**, v.40, n.3, p.694-702, 2010.

BAJEHAJ, A.A. The effects of NaCl priming on salt tolerance in sunflower germination and seedling grown under salinity conditions. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 9, n.12, p.1764-1770, 2010.

BARANDUZI, A. J.; SOFALIAN, O.; ZAKARIA, R. A.; ASGHARI, A.; SHOKRPOUR, M. Assessment of genetic diversity in *Aegilops* species in North-West of Iran using ISSR marker. **Yyü Tar Bil Derg**, v.23, n.2, 66–75, 2013.

BARBOSA, M.H.P. Study of genetic divergence in sugar cane varieties grown in Brazil using the parentage coefficient. **International Sugar Journal**, v.103, n.1231, 2001. p.294-295.

BERTRAND, C.Y.C.; MACKILL, D.J. Marker-assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century. **Philosophical Transactions Of The Royal Society Biological Sciences**, v. 363, p. 557–572, 2008.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. *Seeds: physiology of development and germination*. 2.ed. New York: **Plenum Press**, p.445, 1994.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. *Seeds: physiology of development and germination*. 2.ed. New York: **Plenum Press**, p.445, 1994.

BITTENCOURT, M. C.; DIAS, D. C. F. S.; DIAS, L. A. S.; ARAUJO, E. F. Efeito do condicionamento osmótico das sementes na germinação e no crescimento das plântulas de aspargo. **Revista Brasileira de Sementes** [online], v. 26, p.50-56, 2004.

BONOME, L. T. S.; GUIMARÃES, R. M.; OLIVEIRA, J. A.; ANDRADE, V. C.; CABRAL, P. S. Efeito do condicionamento osmótico em sementes de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu. **Ciência Agrotécnica**, v. 30, n.3, p. 422-428, 2006.

BRADFORD, K. J. Manipulation of seed water relations via osmotic priming to improve germination under stress conditions. **Horticultural Science**, v. 21, p. 1105-1112, 1986.

- BRAGA, L.F.; SOUSA, M.P.; ALMEIDA, T.A. Germinação de sementes de *Enterolobium schomburgkii* (Benth.) Benth. submetidas a estresse salino e aplicação de poliamina. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.11, n.1, p.63-70, 2009.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para Análise de Sementes**. Brasília: Departamento Nacional de Defesa Vegetal, p. 394, 2009.
- BRESSIANI, J.A.; BURNQUIST, W.L.; FUZATTO, S.R.; BONATO, A.L.; GERALDI, I.O. Combining ability in eight selected clones of sugarcane (*Saccharum* spp). **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.3, p.411-416, 2002.
- CALIJA, V.; HIGGINS, A.J.; JACKSON, P.A.; BIELING, L.M.; COOMANS, D. An operations research approach to the problem of the sugarcane selection. **Annals of Operations Research**: Netherlands, v.108, p.123-142, 2001.
- CESNIK, R.; MIOCQUE, J. **Melhoramento da cana-de-açúcar**. Brasília: Embrapa Informações Tecnológicas, p. 307, 2004.
- CHEN, P. H.; PAN, Y.B. CHEN, R.K.; XU, L.P. CHEN, Y.Q.. SSR marker-based analysis of genetic relatedness among sugarcane cultivars (*Saccharum* sp. hybrids) from breeding programs in China and other countries. **Sugar Tech**, v. 11, n. 4, p. 347-354, 2009.
- CHEAVEGATTI-GIANOTTO, A.; ABREU, H. M. C.; ARRUDA, P.; BESPALHOK FILHO, J. C.; BURNQUIST, W. L.; CRESTE, S.; DI CIERO, L.; FERRO, J. A.; FIGUEIRA, A. V. O. ; FILGUEIRAS, T. S.; GROSSI-DE-SÁ, M. F.; GUZZO, E. C.; HOFFMANN, H. P.; LANDELL, M. G. A.; MACEDO, N.; MATSUOKA, S.; REINACH, F. C.; ROMANO, E.; DA SILVA, W. J.; SILVA FILHO, M. C.; ULIAN, E. C. Sugarcane (*Saccharum x officinarum*): A reference study for the Regulation of Genetically Modified Cultivars in Brazil. **Tropical Plant Biology**, v.4, p.62-89, 2011.
- COMAI, L. The advantages and disadvantages of being polyploid. **Nature Reviews Genetics**, New York, v.6, p.836-846, 2005.
- Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento de safra brasileira: cana-de-açúcar, primeiro levantamento**, dezembro/2014 - Companhia Nacional de Abastecimento. - Brasília: Conab 2014.
- CORDEIRO, G.M.; PAN, Y.B.; HENRY, R. J. Sugarcane microsatellites for the assessment of genetic diversity in sugarcane germplasm. **Plant Science**, n. 165, p. 181-189, 2003.
- CORNACCHIA, G.; CRUZ, C. D.; PIRIS, I. E. Seleção combinada e seleção entre e dentro de famílias de meios-irmãos de espécies do gênero *Pinus*. **Revista Árvore**, v. 19, n. 2, p. 200-202, 1995.
- COSTA, M. L. M.; AMORIM, L. L. B.; ONOFRE, A. V. C.; MELO, L. J. O. T.; OLIVEIRA, M. B. M.; CARVALHO, R.; BENKO-ISEPPON, A. M. Assessment of Genetic Diversity in Contrasting Sugarcane Varieties Using Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) Markers. **American Journal of Plant Sciences**, v. 2, p. 425-432, 2011.
- CRUZ, C.D.; REGAZZI, A. J.; CARNEIRO, P.C.S. (2004). Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético, Viçosa: ed. UFV, p. 480.

CUNHA, K. S.; PEREIRA, M. G.; GONÇALVES, L. S. A.; BERILLI, A. P. C. G.; OLIVEIRA, E. C.; RAMOS, H. C. C.; AMARAL JÚNIOR, A. T. Full-sib reciprocal recurrent selection in the maize populations Cimmyt and Piranão. **Genetics and Molecular Research**, v.11, p. 3398-3408, 2012.

D'HONT, A. Unravelling the genome structure of polyploids using FISH and GISH; examples of sugarcane and banana. **Cytogenetics and Genome Research**, Basel, v.109, p.27-33, 2005.

DUTRA FILHO, J. A.; RESENDE, L. V.; BASTOS, G. Q.; NETO, D. E. S.; MACHADO, P. R. Utilização de marcadores moleculares RAPD e EST's SSR para estudo da variabilidade genética em cana-de-açúcar. **Revista Ciência Agronômica**, v. 44, n. 1, p. 141-149, 2013.

FALCONER, D.S.; MACKAY, T.F.C. **Introduction to quantitative genetics**. London:Longman, ed.4, p.464, 1996.

FERREIRA, F.M.; BARBOSA, M. H. P.; CASTRO, R. D.; PETERNELLI, L. A.; CRUZ, C. D Effects of inbreeding on the selection of sugar cane clones. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.5, p.174-182, 2005.

GONÇALVES-VIDIGAL, M. C.; RUBIANO, L. B. Development and application of microsatellites in plant Breeding. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, S1, p.66-72, 2011.

HAIGH, A.M.; BARLOW, E.W.R.; MILTHORPE, F.L.; SINCLAIR, P.J. Field emergence of tomato, carrot and onion seeds primed in aerated salt solution. **Journal of Amercian Society of Horticultural Sciences**, v.111, p.660-665, 1986.

HEINZ, D.J.; TEW, T.L. Hybridization procedures. In D.J. Heinz (ed.) **Sugarcane improvement through breeding**. Elsevier, p.313–342. 1987.

HOFFMAN, L.V.; BARROSO, P.A.V. Marcadores moleculares como ferramentas para estudos de genética de plantas. **EMBRAPA Algodão**, Documentos, 147, 35p. Campina Grande-PB, 2006.

KHAN, A.A. Preplant physiological seed conditioning. **Horticultural Review**, Edinburgh, v. 13, p. 131-181, 1992.

KIMBENG, C.A.; COX, M.C. Early generation selection of sugarcane families and clones in Australia: a review. **Journal American Society of Sugarcane Technologists**, v.23, p.20-39, 2003.

LAKSHMANAN, P.; GEIJSKES, R. J.; AITKEN, K. S.; GROF, C. L. P.; BONNETT, G. D.; SMITH, G. R. Invited Review: Sugarcane Biotechnology: The Challenges and Opportunities. **In Vitro Cellular e Developmental Biology – Plant**, v. 41, p. 345–363, 2005.

LOPES, J. C.; MACEDO, C. M. P. Germinação de sementes de couve chinesa sob influência do teor de água, substrato e estresse salino. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 30, n. 3, p. 79-85, 2008.

MACHADO, J. C.; BARROCAS, E. N.; COSTA, M. L. N.; GUIMARÃES, R. M.; MACHADO, C. F. Uso da técnica de restrição hídrica ou “condicionamento osmótico” em patologia de sementes. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 20, p. 37-63, 2012.

MATSUOKA, S.; GARCIA, A. A. F.; ARIZONO, H. **Melhoramento da cana-de-açúcar**. In: BORÉM, A. (Ed.). Melhoramento de espécies cultivadas. Viçosa: Ed. da UFV, p. 205-251, 2005.

Mc INTYRE, C.L.; JACKSON, P.A. Low level of selfing found in a sample of crosses in Australian Sugarcane Breeding Programs. **Euphytica**, v.117.p.245-249. 2001.

MING, R.; LIU, S.C.; LIN, Y.R.; DA SILVA, J.; WILSON, W.; BRAGA, D.; VAN DEYNZE, A.; WENSLAFF, T.F.; WU, K.K.; MOORE, P.H.; BURNQUIST, W.; SORRELLS, M.E.; IRVINE, J.E.; PATERSON, A.H. Detailed alignment of *Saccharum* and sorghum chromosomes: Comparative organization of closely related diploid and polyploid genomes. **Genetics**, v.150, n. 4, p. 1663-82, 1998.

MING, R.; MOORE, P.H.; WU, K.K.; HONT, A.D.; GLASZMANN, T.L.; TEW, T.E.; MIRKOV, J.; DA SILVA, J.; JIFON, M.; RAI, R.J.; SCHNELL, S.M.; BRUMBLEY, P.; LAKSHMANAN, J.C.; COMSTOCK, A.H. Paterson sugarcane improvement through Breeding and biotechnology. **Plant Breeding Reviews**, v.27, p15-118, 2006.

MUNIZ, F. R. S.; MAURO, A. O. DI. ; UNÊDA-TREVISOLI, S. H.; OLIVEIRA, J. A.; BÁRBARO, I. M.; ARRIEL, N. H. C.; COSTA, M. M. Parâmetros Genéticos e Fenotípicos em Populações Segregantes de Soja. **Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibrosas**, v. 6, n. 3, p. 609-616, 2002.

NASCIMENTO, W. M. **Condicionamento osmótico de sementes de hortaliças**. Brasília: Embrapa, 12p. (Circular Técnica, 33). 2004.

OLIVEIRA, A. B.; MOREIRA, F. J. C.; DUTRA, A. S.; MEDEIROS- FILHO, S. Qualidade Fisiológica de Sementes de Algodão Submetidas ao Condicionamento Osmótico e Secagem. **Revista Brasileira de Ciências Agrária**, v.5, n.3, p.358-363, 2010.

OLIVEIRA, E. J.; PÁDUA, J. G.; ZUCCHI, M. I.; VENCOVSKY, R.; VIEIRA, M. L. C. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, p. 294 -309, 2006.

OLIVEIRA, A. B.; GOMES-FILHO, E. Efeito do condicionamento osmótico na germinação e vigor de sementes de sorgo com diferentes qualidades fisiológicas. **Revista Brasileira de Sementes**, v.32, n.3, p.25-34, 2010.

OLIVEIRA, K.M.; PINTO, L. R.; MARCONI, T. G.; MOLLINARI, M.; ULIAN, E. C.; CHABREGAS, S. M. ; FALCO, M. C.; BURNQUIST, W.; GARCIA, A. A.; SOUZA, A. P. Characterization of new polymorphic functional markers for sugarcane. **Genome**,v. 52, p. 191-209, 2009.

PAN, Y.B. Highly Polymorphic Microsatellite DNA Markers for Sugarcane Germplasm Evaluation and Variety Identity Testing. **Sugar Tech**, v.4, p. 246-256, 2006.

PARIDA, S. K.; KALIA, S.K.; KAUL, S.; DALAL, V.; HEMAPRABHA, G.; SELVI, A.; PANDIT, A.; SINGH, A.; GAIKWAD, K.; SHARMA, T. R.; SRIVASTAVA, P. S.; PESKE, F. B.; NOVEMBRE, A. D. L. C. Condicionamento fisiológico de sementes de milho. **Revista Brasileira de sementes** [online], vol.32, n.4, pp. 132-142, 2010.

PIPERIDIS, G.; PIPERIDIS, N.; D'HONT, A. Molecular cytogenetic investigation of chromosome composition and transmission in sugarcane. **Molecular Genetic Genomics**, v.284, n. 1, p. 65 –73, 2010.

PMGCA-CECA-UFAL-RIDESA. **Relatório Técnico Safra 2008/2009**. Rio Largo-AL, p.105, 2009.

POKHRIYAL, B.; THORAT, K.; LIMAYE, D. A.; JOSHI, Y.M.; KADAM, V. J.; DUBEY, R. Microsatellite markers – A novel tool in Molecular genetics. **International Journal of Research in Pharmacy and Chemistry**, v. 2, p.397 – 412, 2012.

POWELL, W.; MORGANTE, G. B.; ANDRE, C.; HANAFEY, M.; VOGEL, J.; TINGEY, S.; RAFALSKI, A. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. **Molecular Breeding**, v. 2, p.225-238, 1996.

REDDY, M. P.; SARLA, N.; SIDDIQ, E. A. Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) polymorphism and its application plant breeding. **Euphytica**, n. 128, p.9-17, 2002.

RIDESA – **Rede Interuniversitária para o desenvolvimento do setor sucroalcooleiro. Liberação Nacional de Novas Variedades RB de cana-de-açúcar**, Catálogo de novas cultivares. Curitiba, p. 64, 2010.

ROSSE, L. N.; VENCOSKY, R.; FERREIRA, D. F.. Comparação de métodos de regressão para avaliar a estabilidade fenotípica em cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, n. 1, 2002.

SANTOS, J. M.; BARBOSA, G.V.S.; RAMALHO NETO, C. E.; ALMEIDA, C. Efficiency of biparental crossing in sugarcane analyzed by SSR markers. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 14, p. 102-107, 2014.

SANTOS, M. C. A.; AROUCHA, E. M. M.; SOUZA, M. S.; SILVA, R. F.; SOUSA, P.A. Condicionamento Osmótico de Sementes. **Revista Caatinga**, v. 21, n. 2, p. 1-6, 2008.

SILVA, A. F.; FERREIRA, A. C. S. Um estudo sobre a contabilização dos impactos ambientais no setor sucroalcooleiro. Resumo. **9º Congresso de controladoria e contabilidade – Universidade de São Paulo**. 2009.

SILVA, M.A.; GONCALVES, P.S. Inbreeding in sugarcane varieties. **Ciência Rural**, v.41, n.4, 2011.

SILVA, J.A.G. **A methodology for genome mapping of autopolyploids and its application to sugarcane (*Saccharum spp.*)**. Cornell University, p. 108, 1993.

SINGH, R. K.; SINGH, S. P.; MISHRA, P.; SINGH, S.B. STMS markers for tagging high sugar genes in sugarcane. **Sugar Tech**, v.7, n. 2, p. 74–76, 2005.

SINGH, N.K.; MOHAPATRA, T. Informative genomic microsatellite markers for efficient genotyping applications in sugarcane. **Theoretical Applied Genetics**, v.118, p. 327 -338, 2009.

SOUZA Jr., C.L. (1995). Melhoramento de espécies de reprodução vegetativa. Publicação didática, Departamento de Genética, Piracicaba: Esalq/USP, p. 41.

SRIVASTAVA, S.; GUPTA, P.S. Inter Simple Sequence Repeat Profile as a Genetic Marker System in Sugarcane. **Sugar Tech**, v.10, n.1, p.48-52, 2008.

TABASUM, S.; KHAN, F. A.; IGBAL, M. Z.; SAEED, A. DNA profiling of sugarcane genotypes using randomly amplified polymorphic DNA. **Genetics and Molecular Research**, v. 9, n. 01, p. 471-483, 2010.

TEIXEIRA, L. H. M. **Mapeamento funcional em cana-de-açúcar utilizando ESTs como marcadores moleculares**. 2006. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

TEW, T. L.; PAN, Y. B. Microsatellite (Simple Sequence Repeat) Marker-based Paternity Analysis of a Seven-Parent Sugarcane Polycross. **Crop Science**, v.50, p.1401-1408, 2010.

UKOSKIT, K.; THIPMONGKOLCHAROENL, P.; CHATWACHIRAWONG, P. Novel expressed sequence tag- simple sequence repeats (EST-SSR) markers characterized by new bioinformatic criteria reveal high genetic similarity in sugarcane (*Saccharum spp.*) breeding lines. **African Journal of Biotechnology**, v. 11(6), p. 1337-1363, 2012.

WOLFE, A. D. ISSR techniques for evolutionary biology. **Methods Enzimology**, v.395, p.134-144, 2005.

XAVIER, M. A.; PINTO, L. R.; Fávero, T. M.; PERECIN, D.; CARLINI-GARCIA, L.A.; LANDELL, M.G.A. Paternity identification in sugarcane polycrosses by using microsatellite markers. **Genetics and Molecular Research**, n.13, v. 1, p.2268-2277, 2014.

YOU, Q.; XU, L.; ZHENG, Y.; QUE, Y. Genetic Diversity Analysis of Sugarcane Parents in Chinese Breeding Programmes Using gSSR Markers. **The ScientificWorld Journal**, p.11, 2013.

ZHANG, M.Q.; ZHENG, X.F.; YU, A-L.; XU, J-S.; ZHOU, H. Molecular Marker Application in Sugarcane. **Sugarcane Biotechnology**, v. 6, n. 4, p. 251 – 259, 2004.

4. ARTIGO 1: GERMINAÇÃO DE CARIOPSES DE CANA-DE-AÇÚCAR INDUZIDA POR EMBEBIÇÃO CONTROLADA

Periódico a ser submetido: Ciência Rural

RESUMO

Um dos grandes desafios em programas de melhoramento de cana-de-açúcar é a obtenção de cariopses viáveis de cruzamentos controlados para a aquisição de plântulas, que poderão ser novos clones. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da embebição controlada na germinação de cariopses em cruzamentos múltiplo parentais de cana-de-açúcar. Para a embebição controlada foram utilizadas cariopses de três cruzamentos múltiplo parentais, cujos genitores femininos foram as cultivares RB956911, RB972766 e RB867515. Estas foram mantidas em câmara incubadora do tipo B.O.D. a 25°C sob fotoperíodo de 12h, condicionadas em soluções de polietilenoglicol 6.000 (PEG-6.000) nos potenciais de 0,0; -0,6; -0,8 e -1,0 MPa por 12h, 24h, 48h e 72h. As cariopses foram dispostas em papel de germinação embebido nas soluções (2,5 vezes o peso do papel). Após a embebição as sementes foram lavadas em água destilada, secas a temperatura ambiente e em seguida colocadas para germinar em caixas tipo gerbox com papel mata-borrão umedecido com água destilada e avaliadas durante 15 dias de acordo com as Regras para Análise de Sementes (RAS). Para os cruzamentos, houve diferenças na uniformidade da germinação e no percentual de germinação para os tratamentos ($P < 0,05$). O cruzamento RB956911 x ? foi o que apresentou maior porcentagem de germinação (47%), sendo observado maior germinação no potencial -0,8 MPa. Assim, o condicionamento osmótico das cariopses pode ser utilizado para melhorar o desempenho na germinação e o estabelecimento de plântulas de cana-de-açúcar.

Palavras-chave: Sementes. Polietilenoglicol 6000. Plântulas.

ABSTRACT

Título: Sugarcane cariopsis germination induced by controlled imbibition

A major challenge in sugarcane breeding programs is to obtain viable cariopsis through controlled crossings to purchase seedlings, which may be new clones. The objective of this study was to evaluate the influence of controlled imbibition on cariopsis germination in multiple parental crossings of sugarcane. For controlled imbibition cariopsis were used from three crossings whose female parents were the cultivars RB956911, RB972766 and RB867515. The seeds were kept in B.O.D incubator at 25°C under photoperiod of 12h, conditioned in polyethylene glycol 6000 (PEG-6000) in potentials of 0.0; -0.6; -0.8 and -1.0 MPa for 12h, 24h, 48h and 72h. The caryopsis were placed in germination paper soaked in solutions (2.5 times the weight of the paper). After imbibition the seeds were washed in distilled water and then placed to germinate in gerbox with blotting paper moistened with distilled water and evaluated for 15 days according to the Rules for Seed Analysis (RSA). There were differences in the uniformity and percentage of germination for the treatments ($P < 0.05$). The RB956911x? crossings showed the highest germination percentage (47%), and observed an increasing in germination at potential of -0.8 MPa. Thus, the priming of cariopsis can be used to improve the performance of the germination and establishment of sugarcane seedlings.

Key-words: Seeds. Polyethylene glycol 6000. Seedlings.

4.1 Introdução

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) está entre as culturas de maior importância econômica do mundo e tem como principais produtos o açúcar e o etanol, além disso, tem se destacado como uma fonte de energia renovável para a geração de co-energia elétrica (HOFSETZ e SILVA, 2012; PERVAIZ e CORREA, 2009).

Em seu cultivo comercial, são utilizados colmos, que permitem reproduzir o mesmo genótipo por várias vezes. No entanto, em programas de melhoramento genético, a reprodução sexuada torna-se necessária para obter novas combinações genéticas (CABRAL et al., 2011).

Nesta fase reprodutiva, a planta deixa de produzir folhas e colmos e passa a desenvolver a inflorescência, chamada de bandeira ou flecha, constituída de flores completas, pequenas e hermafroditas, as quais apresentam diferentes níveis de viabilidade do grão de pólen (MCINTYRE e JACKSON, 2001). O fruto formado é chamado de cariopse, com pericarpo ao redor de todo o tegumento, seco e indeiscente, não podendo ser separado da semente (BRASIL, 2009).

Para a produção destas sementes, os programas de melhoramento utilizam basicamente o cruzamento biparental (cruzamento entre dois genótipos conhecidos) e o cruzamento múltiplo parental (em que a identidade da planta mãe é conhecida, porém o pólen é oriundo de vários genótipos) (BORÉM, 2005). Este último tipo de cruzamento tem a produção de sementes, em sua maioria, mais viáveis quando comparado com o biparental (BERDING et al., 2004).

Como a base de um bom programa de melhoramento genético é a produção de sementes com alto potencial fisiológico, verifica-se que estas cariopses, quando ocorre a autofecundação causa a depressão por endogamia, conseqüentemente, afeta a fertilidade do pólen, provocar germinação baixa e desuniforme, e a perda da viabilidade rápido quando são armazenadas por um determinado período (MCINTYRE e JACKSON, 2001). Além disso, a cultura é selecionada, dentre outras finalidades, para evitar o estágio de florescimento, entretanto, a ocorrência reduz o potencial produtivo da mesma (CHASE e SENDULSKY, 1991; RODRIGUES, 1995).

A obtenção de sementes com baixa qualidade física, fisiológica, genética e sanitária torna necessária a aquisição de maior número de sementes para formação das mudas e, como poucas sementes são produzidas em cada cruzamento, o gasto inadequado das mesmas pode promover perda de materiais promissores (CAIEIRO et al., 2010).

Para reduzir estas perdas, a embebição controlada de sementes pode ser um tratamento importante para os programas de melhoramento. Pesquisas utilizando sementes pequenas, como de hortaliças e plantas da família Poaceae, têm empregado o método de condicionamento para obter vigor e uniformidade da germinação (BAJEHBAJ, 2010; ANSARI e SHARIF, 2012), pois durante a embebição controlada as sementes são parcialmente hidratadas de modo que as atividades metabólicas iniciais prossigam (McDONALD, 2000).

Similarmente pode-se com o condicionamento osmótico, promover uma embebição controlada da semente, sem a imersão em soluções osmocondicionantes, mas sim utilizando papel embebido em tais soluções (KHAN, 1992). Como agentes osmocondicionantes existem vários tipos de soluções, a exemplo do polietilenoglicol (PEG) que tem sido utilizado com sucesso em muitos trabalhos, por não penetrar nas células devido ao tamanho de suas moléculas que não permite a degradação nem toxidez (HARDEGREE e EMMERICH, 1994; SOUZA e CARDOSO, 2000).

Diante da importância das sementes de cana-de-açúcar em programas de melhoramento, que precisam germinar para que se possa ter a oportunidade de avaliar o seu desempenho enquanto clone, o objetivo deste trabalho foi analisar a influência da embebição controlada na germinação de cariopses empregando cruzamentos múltiplo parentais de cana-de-açúcar.

4.2 Material e Métodos

As cariopses para as análises foram obtidas de três cruzamentos múltiplo parentais: RB956911 x ?; RB972766 x ? e RB867515 x ?. Estes materiais foram oriundos da Estação de Floração e Cruzamentos da Serra do Ouro, localizada no município de Murici – AL, (9°13'S, 35°50'W, 450 m).

O preparo das soluções de polietilenoglicol (PEG 6.000) utilizadas nos testes (0,0; -0,6; -0,8 e -1,0 MPa) foi baseado na equação desenvolvida por Michel e Kaufmann (1973):

$$\Psi_h = -(1,8 \times 10^{-2})C - (1,18 \times 10^{-4})C^2 + (2,67 \times 10^{-4})CT + (8,39 \times 10^{-7})C^2T$$

Sendo:

Ψ_h = potencial hídrico da solução (atm)

C = g de PEG 6000/kg de solução (a ser calculado)

T = temperatura em °C (25°C)

Para evitar o aparecimento de fungos nas cariopses durante o tratamento as soluções foram acrescidas de 0,3% de Captan (Princípio ativo: N – triclorometiltio – 4 – ciclohexano – 1,2 – decarboximida) (KHAN, 1992).

4.2.1 Determinação da curva de embebição

Para a determinação da curva de embebição, foram utilizadas quatro repetições de 25 cariopses cada. Estas foram dispostas uniformemente em papel de germinação (germitest) estéril e umedecido com água destilada (testemunha) na quantidade de 2,5 vezes o peso do papel. O teste foi conduzido em câmara de germinação do tipo B.O.D. a 25°C sob fotoperíodo de 12 horas. As cariopses foram pesadas antes do início do experimento e após 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 48 e 72 horas de embebição, em balança analítica. Antes de cada pesagem, as cariopses foram secas em papel-absorvente e, posteriormente, devolvidas às soluções. Para gerar o gráfico da curva de embebição das cariopses de cana-de-açúcar os dados foram expressos na forma de gráfico por dispersão de seus valores pelo programa Microsoft Office Excel2007, baseado no ganho de massa (g) ao longo do tempo.

4.2.3 Embebição controlada

As cariopses de cana-de-açúcar foram dispostas em papel de germinação (germitest) embebido com soluções de PEG 6.000, na quantidade de 2,5 vezes o peso do papel, nos seguintes potenciais osmóticos: 0,0; -0,6; -0,8 e -1,0 MPa, por 12, 24, 48 e 72 horas, foram

utilizadas quatro repetições de 25 cariopses por tratamento. Os rolos de papel germitest foram mantidos em sacos plásticos, com a finalidade de impedir a perda de umidade no seu interior e colocados em câmara de germinação do tipo B.O.D. a 25°C sob fotoperíodo de 12 horas.

Após os tratamentos, as cariopses foram lavadas em água destilada, para eliminar resíduos das soluções, e colocadas para secar a temperatura ambiente por uma hora. As quatro repetições de 25 cariopses de cada tratamento foram colocadas para germinar em caixas acrílicas do tipo gerbox, entre folhas de papel de germinação tipo mata-borrão, previamente umedecidos com água destilada correspondente a 2,5 vezes o peso do papel, e postas em câmara de germinação do tipo B.O.D. a 25°C sob fotoperíodo de 12 horas.

As avaliações foram realizadas diariamente durante 15 dias de acordo com os critérios estabelecidos pelas Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009), sendo consideradas germinadas as cariopses que apresentaram plântulas normais. A partir disso, estimou-se o percentual de Germinação (%G). E o Índice de Velocidade de Germinação (IVG) seguindo a fórmula Maguire, (1962):

$$IVG = G_1/N_1 + G_2/N_2 + \dots + G_n/N_n$$

Sendo:

IVG = Índice de velocidade de Germinação (sementes. dia⁻¹);

G₁, G₂, G_n= número de sementes germinadas computadas na primeira contagem, na segunda contagem e na última contagem;

N₁, N₂, N_n= número de dias da semeadura à primeira, a segunda e a enésima contagem.

O delineamento experimental empregado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial 3x4x4, representado por três cruzamentos (RB956911 x ?, RB972766 x ? e RB867515 x ?), quatro tempos (12h, 24h, 48h e 72h), quatro potenciais (0,0; -0,6; -0,8 e -1,0 MPa) e quatro repetições de 25 cariopses.

Os dados foram transformadas em arco seno $(X/100)^{0,5}$, analisados estatisticamente com o programa SISVAR (FERREIRA, 2000), usando o teste F para análise de variância, o teste de Tukey para a comparação de médias entre os diferentes cruzamentos e regressão polinomial para verificar a influência dos tempos e dos potenciais osmóticos.

4.3 Resultados e discussão

4.3.1 Curva de embebição de cariopses de cana-de-açúcar

Conforme os resultados da curva de embebição (Figura 1), pode-se verificar que as cariopses de cana-de-açúcar apresentaram padrão trifásico de embebição de acordo com modelo proposto por Bewley e Black (1994).

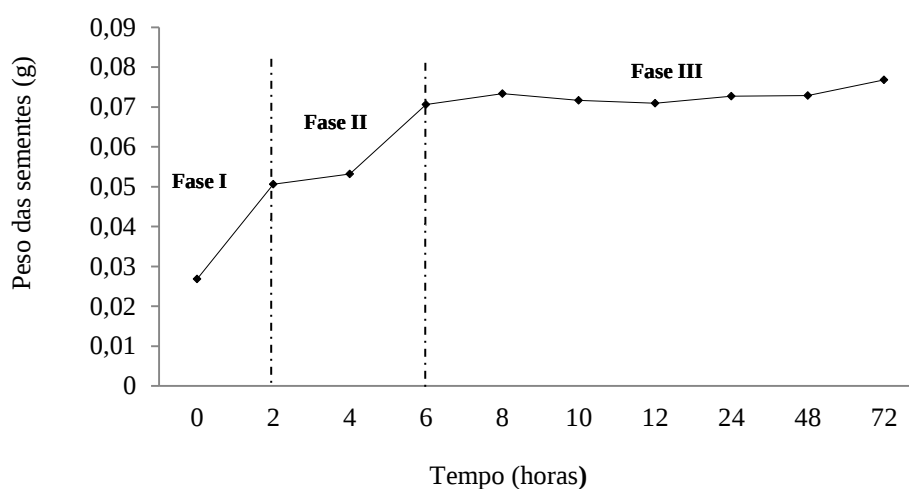


FIGURA1. Curva de embebição em água de cariopses de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.), baseada no peso de massa (g) ao longo do tempo (horas). UFS, São Cristóvão, Sergipe, 2015.

Para as cariopses de cana-de-açúcar, o início da Fase I foi verificado entre os períodos de 0 a 2 horas, caracterizados pela rápida absorção de água e aumento do peso das sementes, esta fase possui uma duração de duas horas, mais curta do que a Fase II.

A Fase II foi observada entre 2 e 6 horas de embebição, as cariopses absorvem pouca água. Esta lenta absorção de água na segunda fase acontece devido ao equilíbrio do potencial osmótico e o potencial de pressão, sendo o momento em que as sementes adquirem condições físico-químicas para reativação de seu metabolismo (BEWLEY e BLACK, 1994; MANZ et al., 2005).

A Fase III foi observada entre 6 e 72 horas, caracterizada pelo aumento de absorção água e a emissão da radícula das cariopses.

Ao conhecer a duração de cada fase da curva de embebição, estes resultados podem auxiliar em estudos de condicionamento fisiológico das cariopses de cana-de-açúcar, contribuindo para determinação do conteúdo necessário para germinação nesta espécie.

4.3.2 Embebição controlada em cariopses de cana-de-açúcar

Nos resultados da análise de variância constatou-se que para porcentagem de germinação e índice de velocidade de germinação (IVG) de cariopses dos três cruzamentos, houve efeitos significativos para o fator potencial osmótico, cruzamento e a interação cruzamento x potencial x tempo ($p \leq 0,05$).

No primeiro cruzamento, que tem a cultivar RB956911 como genitor feminino, verificou-se que a porcentagem de germinação das cariopses nos potenciais osmóticos -0,6 e -0,8 MPa foram superiores à testemunha e a -1,0 MPa (Figura 2).

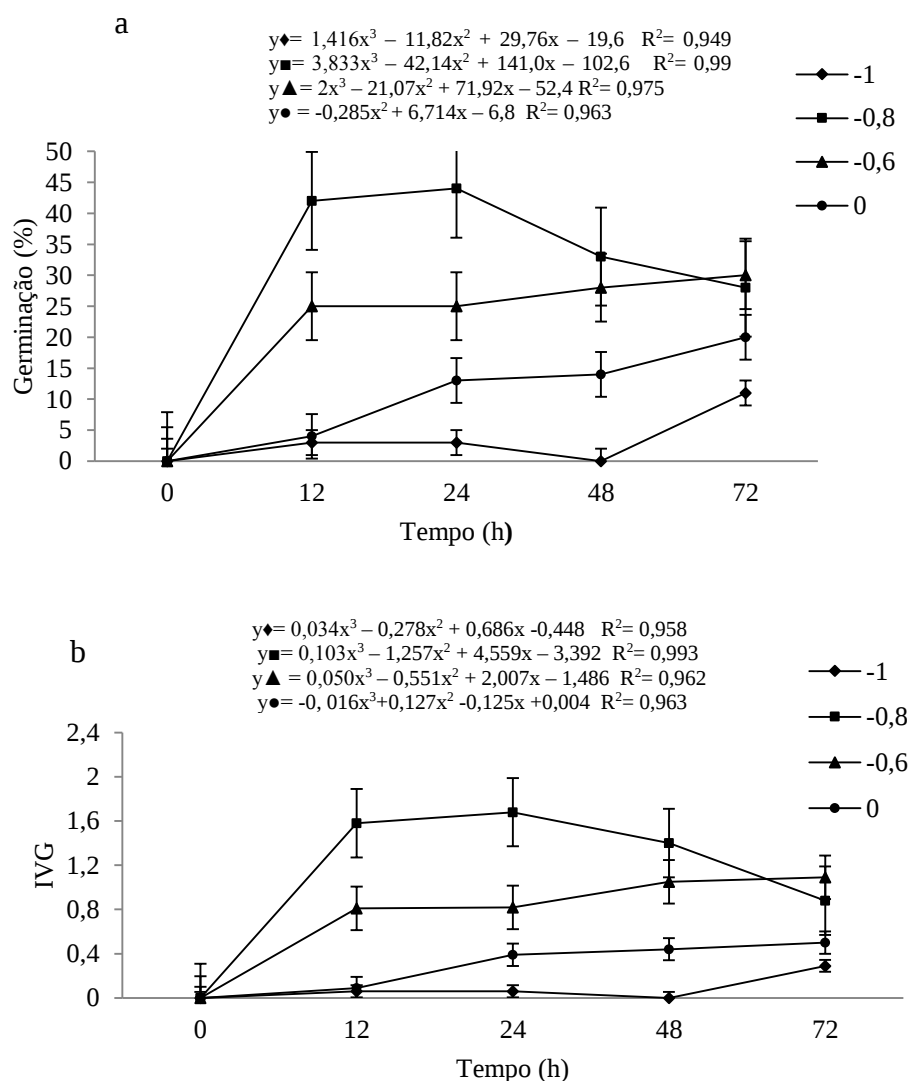


FIGURA 2. Porcentagem de germinação (a) e o Índice de velocidade de germinação (b) de cariopses de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) do cruzamento RB956911 x ? em função do tempo (horas) e da embebição controlada em solução de PEG-6.000 (0,0;-0,6;-0,8 e -1;0 MPa).UFS, São Cristóvão, Sergipe, 2015.

Para o potencial -1,0 MPa houve redução na germinação até 48 horas de embebição e aumento após 72 horas, mas a testemunha foi superior a este potencial. Isto mostra que para potenciais maiores que -0,8 MPa ocorre influência na germinação das cariopses de cana-de-açúcar, possivelmente devido a uma maior redução na absorção de água.

Para os valores de IVG, houve influência da embebição controlada para os potenciais -0,6 e -0,8 MPa (1,09 e 1,69).

Com a redução no potencial osmótico da solução de PEG 6.000, houve contribuição para o aumento do índice de velocidade da protrusão radicular das sementes de *Brachiaria brizantha* em relação à testemunha por um período de 12 horas (BONOME et al., 2006).

Os resultados da porcentagem de germinação e IVG do segundo cruzamento (RB972766 x ?), encontram-se na Figura 3.

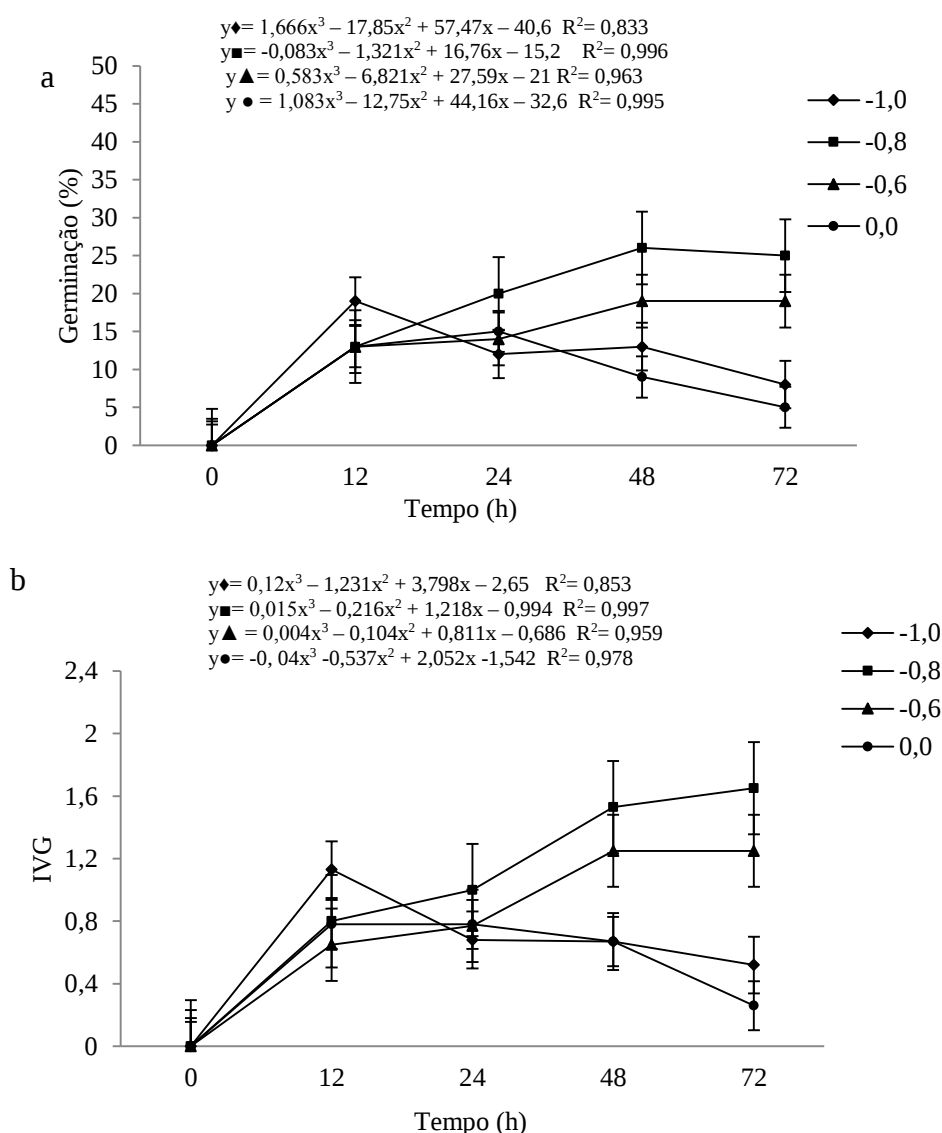


FIGURA 3. Porcentagem de germinação (a) e Índice de velocidade de germinação (b) em cariopses de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) do cruzamento RB972766 x ? em função do tempo (horas) e da embebição controlada em solução de PEG-6000 (0,0;-0,6;-0,8 e -1,0 MPa).UFS, São Cristóvão, Sergipe, 2015.

Para o potencial -0,8MPa observou-se maior porcentagem de germinação (26%) em 48 horas, seguido de um decréscimo para os demais potenciais e tempo de embebição controlada. Houve comportamento similar entre IVG e germinação.

A germinação das cariopses do terceiro cruzamento (RB867515 x ?), os potenciais -0,6 e -0,8 MPa apresenta percentual elevado de germinação de 33 e 23%, respectivamente (Figura 4). Valores inferiores foram observados para as cariopses que germinaram a 0,0 e -1,0 MPa.

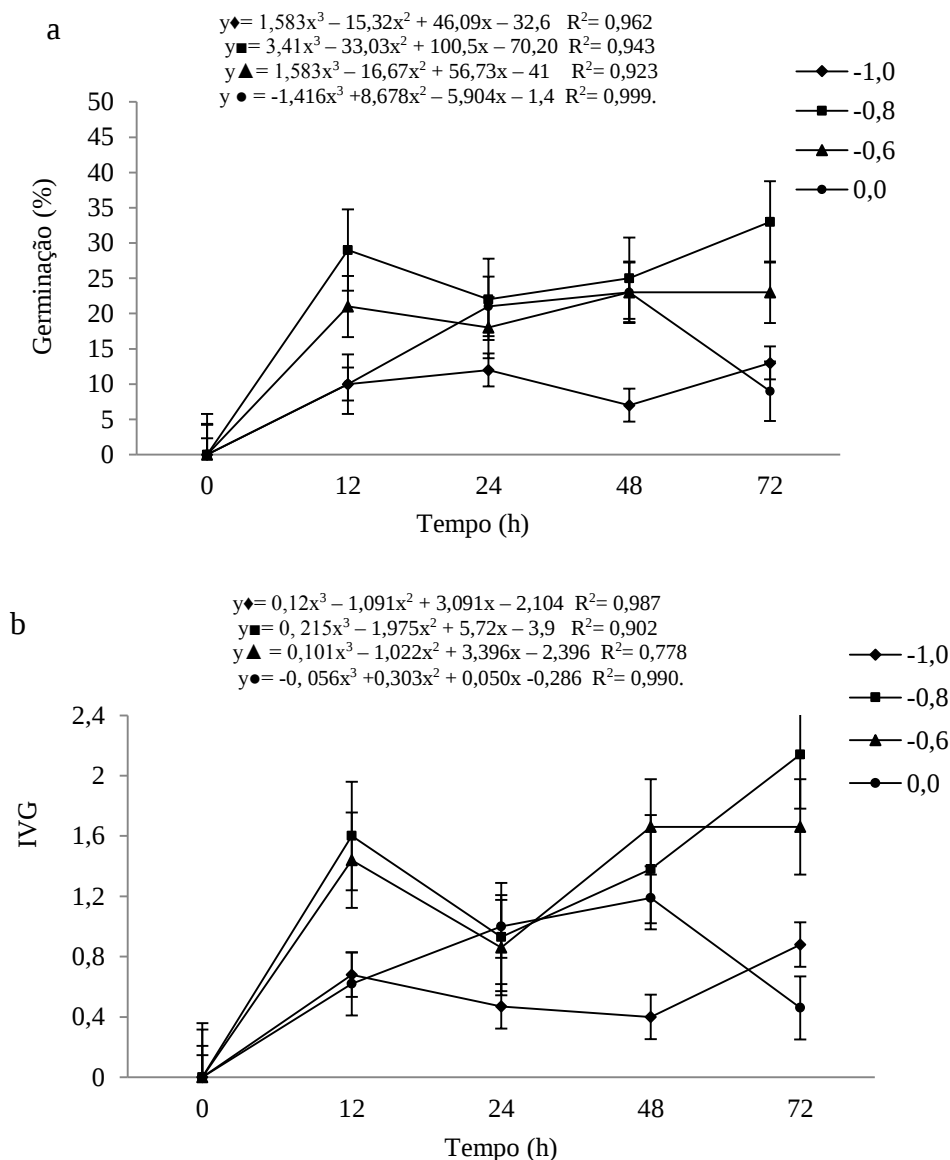


FIGURA 4. Porcentagem de germinação (a) e índice de velocidade de germinação (b) em cariopses de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) do cruzamento RB867515 x ? em função do tempo (horas) e da embebição controlada em solução de PEG-6.000 (0,0;-0,6;-0,8 e -1;0 MPa).UFS, São Cristóvão, Sergipe, 2015.

Observou-se que a embebição controlada com a redução no potencial osmótico promoveu aumento na porcentagem e uniformidade de germinação das cariopses, da mesma forma ocorreu para o IVG.

Isto pode ter acontecido devido à hidratação lenta obtida com a embebição controlada, que permite um maior tempo para a reparação ou reorganização da membrana plasmática, que possibilita a formação dos tecidos de maneira mais ordenada e reduz os riscos de danos ao eixo embrionário (CASTRO et al., 2004).

Os potenciais -0,9 e -1,5 MPa a $15 \pm 1^\circ\text{C}$ (PEG 6.000), foram constatados benefícios na germinação das sementes de centeio (*Secale montanum*) e emergência das plântulas, melhoramento fisiológico, ativando as reações metabólicas, as quais influenciam nas reservas, ocasionando o bom desempenho das plântulas (ANSARI et al., 2012).

Para os três cruzamentos houve diferença na porcentagem de germinação e na uniformidade da germinação para os tratamentos ($P < 0,05$), mais não ocorreu diferença significativa para a testemunha. O IVG diferiu para o potencial -0,6 MPa no cruzamento RB956911 x ? (Tabela 1).

TABELA1. Resultados médios de porcentagem de germinação (% G) e Índice de velocidade de germinação (IVG) de cariopses de cana-de-açúcar submetidas a embebição controlada em diferentes potenciais osmótico (0,0; -0,6; -0,8 e -1,0 MPa). UFS, São Cristóvão, Sergipe, 2015.

Germinação				IVG		
Potencial	RB 956911x?	RB 972766 x?	RB 867515x ?	RB 956911x ?	RB 972766x ?	RB 867515x ?
0,0 MPa	12,7a	10,5 a	15,7 a	0,3 a	0,6 a	0,8 a
-0,6 MPa	27,0 a	16,3 b	21,3 ab	1,4 a	0,9 b	0,9 b
-0,8 MPa	47,0 a	21,0 b	27,2 b	1,3 a	1,2 a	1,5 a
-1,0 MPa	4,2 b	13,0 a	10,0 ab	0,2 a	0,7 a	0,6 a
CV (%)	44,39			CV (%)	52,52	

Médias seguidas de mesma letra na linha não diferem entre si, Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Para o potencial -0,6 e -0,8MPa cariopses do cruzamentos RB956911x? apresentaram maior porcentagem de germinação (47%) em relação aos outros dois cruzamentos. No potencial -1,0 MPa cariopses do cruzamento RB972766x? apresentou porcentagem de germinação de 13%, que diferiu dos demais. Observou-se que a porcentagem de germinação foi baixa comparada a outras culturas agrícolas, porém esperada para a cultura da cana-de-açúcar.

Essa baixa germinação pode estar relacionada a problemas ocorridos durante o processo de floração, hibridação ou maturação das sementes, os quais podem afetar a capacidade germinativa das sementes e, conseqüentemente, apresenta baixa taxa de formação de sementes, as quais possuem pouca viabilidade (CABRAL et al., 2011).

Além disso, a forma de propagação comercial da cana-de-açúcar é assexuada, ao contrário de outras culturas agrícolas, normalmente selecionadas pela maior fertilidade, visando aumentar a produção de sementes, visto que o processo de florescimento reduz a quantidade de açúcar armazenado no caule (CHASE e SENDULSKY, 1991; RAO, 1982).

A germinação de cariopses de cana-de-açúcar submetidas ao tratamento com PEG 6.000 nos potenciais -0,6 e -0,8 MPa foi superior a testemunha (0,0 MPa-água). Assim, o condicionamento osmótico das cariopses pode ser utilizado para promover o preparo fisiológico das cariopses promovido pela germinação lenta, e o estabelecimento de plântulas. A ocorrência também observada por Alves et al. (2012) estudando o efeito deste sobre o desempenho de sementes de rúcula.

O maior índice de velocidade de germinação (IVG) foi constatado nas cariopses para o potencial -0,6 MPa no cruzamento RB956911x? da mesma forma que foi observado para a porcentagem de germinação (Tabela 1). Assim, além de incremento na porcentagem de germinação houve melhoria no vigor das cariopses.

As principais vantagens do condicionamento das sementes é a maior velocidade de emergência das plântulas favorecendo a tolerância às adversidades climáticas (CANTLIFF, 2003).

Efeito benéfico também ocorreu em sementes de milho doce com solução de PEG 8.000 a 10%, sendo observada melhoria no vigor das sementes e aumento da resistência ao estresse salino na fase de germinação (HASSANZADEH et al., 2013).

De acordo com os resultados analisados para o potencial -0,8MPa observou-se melhor desempenho na porcentagem de germinação das cariopses de cana-de-açúcar em relação aos outros potenciais para os cruzamentos RB956911x ?. Desta forma, a absorção de água pelas cariopses, provavelmente foi lenta o suficiente para promover reparos nas células e iniciar as atividades metabólicas da germinação, devido aos íons da solução de PEG que ficam aderidos externamente às sementes, e assim contribuem para um decréscimo do potencial osmótico no interno da semente.

4.4 Conclusão

A embebição controlada favorece a uniformidade da germinação e a expressão do vigor de cariopses de cana-de-açúcar, empregando o condicionamento de -0,8 MPa.

4.5 Referências Bibliográficas

ANSARI, O.; SHARIF ZADEH, F. Osmo and hydro priming mediated germination improvement under cold stress conditions in mountain rye (*Secale montanum*). **Cercetari Agronomice in Moldova**, v. 45 , n. 3, p.151, 2012.

ANSARI, O.; CHOGHAZARDI, H.R.; SHARIF ZADEH, F.; NAZARLI, H. Seed reserve utilization and seedling growth of treated seeds of mountain ray (*Secale montanum*) as affected by drought stress. **Cercetari Agronomice in Moldova**, v.2, n.150, p. 43-48, 2012.

ALVES, J. ; BARBOSA, R. M.; COSTA, D. S.; SÁ, M. E. Condicionamento osmótico e desempenho fisiológico de sementes de rúcula. **Revista Biotemas**, São Paulo, v. 25 n. 1, p. 171,2012.

BAJEHBAJ, A.A. The effects of NaCl priming on salt tolerance in sunflower germination and seedling grown under salinity conditions. **African Journal of Biotechnology**, v.9, p.1764-1770, 2010.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. Seeds: physiology of development and germination.2.ed. New York: **Plenum Press**, p.445, 1994.

BERDING, N.; HOGARTH, D.M.; COX, M.C. 2004.**Plant improvement of sugarcane**. p. 20–53. In J. Glyn (ed.) Sugarcane. Blackwell Science Ltd., Oxford.

BISCHOFF, K. P.; GRAVOIS, K. A. The development of new sugarcane varieties at the LSU AgCenter. **Journal American Society Sugar Cane Technologists**, v. 24, 2004.

BONOME, L. T. S.; GUIMARÃES, R. M.; OLIVEIRA, J. A.; ANDRADE, V. C.; CABRAL, P. S. Efeito do condicionamento osmótico em sementes de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu.**Ciência Agrotécina**, v. 30, n.3, p. 422-428, 2006.

BORÉM, L. (2005). **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa: Universidade Federal de Viços 2ed., p.225-274.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para Análise de Sementes**. Brasília: Departamento Nacional de Defesa Vegetal, p. 394, 2009.

CABRAL, F. F.; SILVA, C. B.; FERREIRA, V. M.; ARAÚJO NETO, J. C.; BARBOSA, G. V. S. Fertilidade de cruzamentos, potencial fisiológico e armazenamento de sementes de cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Tecnologia Aplicada nas Ciências Agrárias**, Guarapuava-PR, v.4, n.1, p.66–82, 2011.

CAIEIRO, J. T.; PANOBIANCO, M.; BESPALHOK FILHO, J. C.; OHLSON, O. C. Physical purity and germination of sugarcane seeds (caryopses) (*saccharum* spp.). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 32, n.2, p. 140-145, 2010.

CANTLIFF, D.J. 2003.Seed Enhancements.**Acta Horticulturae** 607: 53-59.

CASTRO, R.D; BRADFORD, K.J.; HILHORST, H.W.M. 2004. Embebição e reativação do metabolismo. In Germinação: do básico ao aplicado (A.G. Ferreira & F. Borghetti, orgs.). Porto Alegre, Artmed, 149-162.

CHASE, A.; SENDULSKY, T. **Primeiro livro de gramíneas: noções sobre a estrutura com exemplos da flora brasileira**. São Paulo: Instituto de Botânica, 125p. 1991.

FERREIRA, D. F. **Manual do sistema Sisvar para análises estatísticas**, Lavras, Universidade Federal de Lavras, p. 66, 2000.

GUIMARÃES, M.A.; DIAS, D.C.F.S.; LOUREIRO, M.E. Hidratação de sementes. **Revista Trópica**, v.2, n.1, p.31-39, 2008.

HARDEGREE, S. P.; EMMERICH, W. E. Seed germination response to polyethylene glycol solution depth. **Seed Science and Technology**, v. 22, n. 1, p. 1-7, 1994.

HASSANZADEH, S.; JAFARNEZHAD, A. GOLBEDAGHI, R. Effects of Seed Priming on Components Germination the Sweet Corn (*Zea mays* Cv. Basin) at Different Levels of Salinity. **Journal of Agriculture and Food Technology**, v3, p. 6-11, 2013.

KHAN, A.A. Preplant physiological seed conditioning. **Horticultural Reviews**, v.13, p.131-181, 1992.

HOFSETZ, K.; SILVA, M. A. Brazilian sugarcane bagasse: Energy and non-energy consumption. **Biomass Bioenergy**, v. 46, p. 564-573, 2012.

MAGUIRE, J. D. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, v. 2, n. 1, p. 176-177, 1962.

MANZ, F.; MULLER, K.; KUCERA, B.; VOLKE, F.; LEUBNER-METZGER, G. Water Uptake and Distribution in Germinating Tobacco Seeds Investigated in Vivo by Nuclear Magnetic Resonance Imaging. **Plant Physiology**, v.138, n.3, p.1538-1551, 2005.

MCDONALD, M. B. Seed deterioration: physiology, repair and assessment. **Seed Science and Technology**, v. 27, n. 1, p. 177-237, 2000.

MICHEL, B. E.; KAUFMANN, M. R. The osmotic potential of polyethyleneglycol 6000. **Plant Physiology**, v.51, n.6, p.914-6, 1973.

MWALE, S.S., HAMUSIMBI, C.; MWANSA K. Germination, emergence and growth of sunflower (*Helianthus annuus* L.) in response to osmotic seed priming. **Seed Science and Technology**, v.31, p.199-206, 2003.

OLIVEIRA, A. B.; GOMES-FILHO, E. Efeito do condicionamento osmótico na germinação e vigor de sementes de sorgo com diferentes qualidades fisiológicas. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 32, n.3, p.25-34, 2010.

RAO, P.S. Sugarcane seed storage for breeding and generic conservation. In: **Seminário Inter Americano de lacaña de azúcar**– Variedades. Flórida Internacional University. Miami. Usa, 1982.

PERVAIZ, M.;CORREA, C. A. Biorrefinaria: desenvolvimento de plataformas químicas através de tecnologias de biomassa. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 19, p.9-11, 2009.

RODRIGUES, J.D. **Fisiologia da cana-de-açúcar**. Botucatu: Unesp, 1995. 99p.

SOUZA, G.M.; CARDOSO, V.J.M. Effects of different environmental stresses on seed germination. **Seed Science and Technology**, v.28, p.621-630, 2000.

5 ARTIGO 2. DIVERSIDADE INTRA E INTER GENOTÍPICA EM CRUZAMENTOS BIPARENTAIS DE CANA-DE-AÇÚCAR USANDO MARCADORES ISSR

Periódico a ser submetido: Genetics Molecular Research - GMR

RESUMO

Uma das principais preocupações dos programas de melhoramento genético de cana-de-açúcar são a alta produtividade e melhoria na qualidade da matéria prima para a fabricação de açúcar e etanol. Para garantir a rentabilidade do setor é indispensável à seleção de novas cultivares para obter ganhos genéticos. Assim, a avaliação da variabilidade genética intra e inter genótipos utilizando marcadores de DNA favorece a seleção de cruzamentos, possivelmente progênes promissoras. O objetivo deste trabalho foi analisar a diversidade genética em cruzamentos biparentais de cana-de-açúcar empregando marcadores ISSR. Foram utilizados 16 progênes de cada cruzamento (RB9419XRB99371; RB9364XRB93509 e RB855511X RB92579). O DNA foi extraído de plantas e as reações de ISSR foram conduzidas com 22 *primers*, dos quais 14 apresentaram polimorfismo no padrão das bandas amplificadas. Foram obtidas as seguintes informações: número de alelos observados, número de alelos efetivos, índice de Shannon, número de alelos exclusivos, heterozigosidade esperada, diversidade gênica de Nei e porcentagem de locos polimórficos. Na avaliação da similaridade entre os genótipos houve a formação de três grupos, cada um formado por um cruzamento. O cruzamento RB9419XRB99371 apresentou maiores valores de diversidade genética para os parâmetros analisada em relação aos outros dois cruzamentos. A similaridade média do cruzamento RB9419XRB99371 foi de 32,7%; o RB9364XRB93509 foi de 44,9% e para o cruzamento RB855511XRB92579 foi de 76,8%.

Palavras-chave: Hibridação. Alelos. Progênes.

ABSTRACT

Título: Intra and inter genetic variability in biparental crosses of sugarcane using ISSR markers

A major concern of genetic breeding sugarcane programs are high productivity and improvement in quality of raw material for the production of sugar and ethanol. To guarantee the sector's profitability is essential the selection of new cultivars for genetic gains, and evaluation of intra genetic variability and inter genotypes using DNA markers favors the selection of crossings, possibly most promising progenies. The objective of this study was to analyze the intra and inter genetic diversity in parental crossings of sugarcane sugar. We used three crossings (RB9419XRB99371; RB9364XRB93509 and RB855511XRB 92 579) and 16 progenies for each crossing. The DNA was extracted from plants and ISSR reactions were performed with 22 primers, 14 were selected by polymorphism pattern of amplified fragments. The following information was obtained: number of observed alleles, effective number of alleles, Shannon index, number of unique alleles, expected heterozygosity, genetic diversity of Nei and percentage of polymorphic loci. In assessing the similarity between the genotypes for the formation of three groups, each consisting of a cross. The RB9419XRB99371 crossing had higher genetic diversity values for the vestments analyzed in relation to the other two crosses. The average similarity of RB9419XRB99371 crossing was 32.7%; The RB9364XRB93509 was 44.9% and the cross RB855511XRB92579 was 76.8%.

Key-words: Hybridization. Alleles. Progenies.

5.1 Introdução

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) é uma das principais culturas agrícolas do Brasil, devido ao seu potencial na produção de alimentos e combustível renováveis que têm elevada expressão sócio-econômica (HOFSETZ e SILVA, 2012). Diante disso, a busca por novas cultivares por meio do melhoramento genético tem possibilitado o desenvolvimento de clones mais promissores e resistentes aos principais estresses bióticos e abióticos.

O desenvolvimento dessas cultivares, pelos programas de melhoramento têm como principal estratégia a propagação sexuada para a obtenção de variabilidade genética, consequentemente, progênies superiores, as quais passam por várias seleções para serem lançadas como uma nova cultivar (LUCIUS et al., 2014). Este processo, normalmente é realizado empregando genitores divergentes, usando basicamente dois tipos de cruzamentos: biparental e policruzamento (BERDING et al., 2004).

A busca por recombinações gênicas possibilita a formação de família com maior variabilidade genética, possivelmente maior probabilidade de obter indivíduos com melhores caracteres a serem transmitidos entre gerações. Assim, a diversidade genética proporciona informações sobre a variação genética existente entre os genótipos, além da identificação de parentais divergentes para serem utilizados nos cruzamentos (LUCIUS et al., 2014).

A combinação de seleção entre e dentro de famílias é mais eficaz, por aumentar a probabilidade de maiores ganhos genéticos, do que a seleção individual (STRINGER et al., 2011). Ainda assim, a seleção de indivíduos dentro das famílias passa, necessariamente, pelo processo de avaliação visual o que torna difícil obter dados em nível individual (PEDROZO et al., 2008).

Essas seleções nas fases iniciais dos programas de melhoramento podem acelerar o processo de obtenção dos genótipos superiores em um menor espaço de tempo, consequentemente, reduzir os gastos da manutenção das famílias experimentais (MARCONI et al., 2011).

Uma das estratégias que tem auxiliado é o uso de ferramentas moleculares possibilitando o monitoramento da diversidade genética dos cruzamentos que estão sendo trabalhados e seleção de famílias a serem recombinadas para maximizar a heterose entre os cruzamentos (MARCONI et al., 2011; BERILLI et al., 2011).

Dentre estes marcadores o ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats* – Inter Sequências Simples Repetidas) é uma técnica rápida, simples, por não necessitar de *primers* específicos, possuem de 16 a 25 pares de bases e contém sequências de dois ou três nucleotídeos. Estes têm se destacado como uma alternativa eficiente para determinar a distância genética entre

parentais, a diversidade entre e intra específica, além de caracterizar e avaliar o germoplasma (WOLFE, 2005; SANTOS et al., 2013).

A diversidade genética entre as cultivares de cana-de-açúcar é essencial, devido à estreita formação da base genética em famílias melhoradas, ou seja, o cruzamento entre cultivares comerciais e espécies selvagens de coleções de germoplasma tem sido realizado em muitos programas de melhoramento (LANDELL e BRESSIANI, 2008), pois a composição genética dos clones selecionados é fixada pela propagação vegetativa, a qual reproduz os caracteres ao longo dos anos (FERREIRA et al., 2005).

Marcadores ISSR têm sido utilizados em estudos de diversidade genética em muitas plantas da família Poaceae, incluindo milho (CUNHA et al., 2012) e trigo (SIDDIG et al., 2013). Na cana-de-açúcar, verificou-se a diversidade genética entre nove variedades, cultivadas em diferentes regiões do Nordeste do Brasil e de duas variedades da Índia, utilizando doze *primers* ISSR. Com isso variedades tolerantes e suscetíveis à seca foram claramente separadas, comprovando a eficiência desse marcador para discriminar genótipos contrastantes (COSTA et al., 2011).

Neste trabalho, o objetivo foi analisar a diversidade genética em cruzamentos biparentais de cana-de-açúcar por meio de marcadores ISSR.

5.2 Material e Métodos

5.2.1 Material vegetal

Foram empregadas 16 progênes F_1 de três cruzamentos: RB9419XRB99371; RB9364XRB93509 e RB855511XRB92579. O método de hibridização entre os genitores foi realizado de acordo com os procedimentos padrão do programa de melhoramento genético da RIDESA (Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroenergético) (ROCHA et al., 2008). As cariopses obtidas foram armazenadas em câmara fria. De cada um dos cruzamentos foram pesados cinco gramas de cariopses e estas foram semeadas em bandejas plásticas, previamente identificadas e após 50 dias as plantas foram transplantadas em campo.

5.2.2 Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Nienhuis et al. (1995) com modificações.

De cada progênie foram utilizados 2g de folhas novas para maceração com o auxílio de almofariz e pistilo, onde adicionou-se 10 mL de tampão CTAB 2% (2% de CTAB, 100mM de Tris (pH8,0), 20mM de EDTA (pH 8,0), 1,4M de NaCl e 1% de PVP) e 20 μ L de β -mercaptoetanol, para retardar a oxidação de metabólitos secundários. O macerado foi transferido para tubos de ensaio e levados ao banho-maria a 65°C por 60 minutos.

Após esse período de incubação as amostras foram purificadas com a adição de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) e centrifugadas a 7.000 Xg por 30 minutos. O sobrenadante obtido foi micropipetado e a ele adicionado álcool:acetato de amônio, mantido a -20°C *overnight* para precipitação do DNA. As amostras foram centrifugadas a 14.000 Xg por 10 minutos e em seguida, o álcool: acetato de amônio foi descartado e substituído por etanol, deixando-se 10 minutos em temperatura ambiente. Uma nova centrifugação foi realizada por 10 minutos a 14.000 Xg , sendo assim possível descartar o sobrenadante e secar o precipitado em temperatura ambiente. O DNA foi solubilizado em TE (1mM de Tris e 0,1mM de EDTA).

A concentração de DNA de cada amostra foi determinada em fluorímetro (DQ300 Quick Reference Guide).

5.2.3 Reação de ISSR

Para as reações de ISSR foram testados 22 *primers*. As reações de PCR continham 12 µL do volume final (1,5 µM de DNA [5ngµL⁻¹], 2 µM de *primer* [2µM] e 8,5 µL do mix TopTaq Master Mix Kit(Qiagen)). A amplificação consistiu de uma temperatura inicial de 94°C por 5 minutos, seguida por 35 ciclos de amplificação em 94°C por 40 segundos, temperatura de anelamento de 50°C por 30 segundos para cada *primers*, 72°C por 1 minuto e 72°C por 7 minutos.

Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão TBE 0,5X, a 100 V por 1 hora e 40 minutos e corados com *GelRed nucleic acid stain*. Posteriormente, os géis foram fotografados sob luz UV, em transilluminator digital (Benchtop).

5.2.4 Análise dos dados ISSR

A partir dos padrões de amplificação foram obtidos fragmentos que foram usados para a construção de uma matriz binária, quanto à presença (1) ou ausência (0) de fragmentos. Com a matriz binária calculou-se a similaridade genética (S_{gij}) entre e dentro dos cruzamentos de cana-de-açúcar, por meio do coeficiente de Jaccard, empregando-se o programa NTSYS 2.0 (ROHLF, 2001). As similaridades obtidas foram calculadas com base na seguinte expressão:

$$S_{ji} = a / a + b + c$$

Em que:

a = número de casos em que ocorre a presença de fragmento em ambos os indivíduos, simultaneamente;

b = número de casos em que ocorre a presença de fragmento somente no indivíduo i;

c = número de casos em que ocorre a presença de fragmento somente no indivíduo j.

Para a representação simplificada dos dados de similaridades foi construído um dendrograma, obtido pelo método de agrupamento UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method Arithmetic Average* – Agrupamento aos Pares pela Média Aritmética Não Ponderada), utilizando-se o programa NTSYS 2.0 (ROHLF, 2001).

O conteúdo de informação polimórfica (PIC) foi calculado em função do número de alelos detectados, da sua distribuição e frequência nos grupos estudados (POWELL et al., 1996). Os valores de PIC por loco foram determinados pela expressão:

$$PIC = 1 - \sum p_{ij}^2$$

Em que:

p_i é a frequência do i-ésimo alelo marcador j.

A caracterização da diversidade genética, foi representada pela dispersão gráfica dos genótipos com base no método da Análise de Coordenadas Principais (PCoA), indicada para conjuntos de medidas correlacionadas linearmente, o que permite reduzi-las a poucas variáveis sintéticas pelo o programa GenAlEx 6.3 (PEAKALL e SMOUSE, 2006). Empregando o mesmo programa foi analisada a diversidade genética dos cruzamentos, com os seguintes parâmetros:

- Número de alelos observados (N_a);
- Porcentagem de locos polimórficos ($P\%$);
- Número de Alelos exclusivos (A_e);
- Número de alelos efetivos (N_e);
- Índice de Shannon (I);
- Heterozigosidade esperada de Nei (H_e) (1973).

5.3 Resultados e discussão

Dos 22 *primers* testados, 14 foram selecionados por apresentarem melhor perfil de amplificação (Tabela 1).

TABELA 1. Relação do número de bandas amplificadas para cada *primer* ISSR em cruzamentos biparentais de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp). Número total de bandas (NTB), Número de bandas polimórficas (NBP) e Conteúdo de informação polimórfica (PIC).

Primers ISSR	RB9419 X RB99371			RB9364 X RB93509			RB855511 X RB92579		
	NTB	NBP	PIC	NTB	NBP	PIC	NTB	NBP	PIC
AW3(GT)6-RG	8	7	0,973	12	10	0,951	5	2	0,846
DAT(GA)7-RG	24	24	0,993	12	11	0,972	8	3	0,9074
GOOFY(GT)7-YG	11	8	0,953	5	5	0,875	5	1	0,808
JOHN(AG)7-YG	8	8	0,973	7	7	0,932	7	5	0,902
M2 GGGC-(GA)8	12	12	0,962	10	6	0,930	6	4	0,881
MANY(CAC)4-RC	7	4	0,920	7	2	0,894	5	0	0,800
TERRY(GTG)4-RC	15	15	0,964	8	4	0,901	8	5	0,903
UBC 807(GA)8-T	11	7	0,933	5	4	0,920	4	4	0,915
UBC 809(AG)8-G	8	6	0,909	5	3	0,871	5	3	0,903
UBC 810(GA)8-T	11	11	0,989	4	4	0,923	3	1	0,678
UBC 813(CT)8-T	7	7	0,971	7	6	0,946	6	3	0,881
UBC 825(AC)8-T	9	8	0,948	7	7	0,928	6	4	0,896
UBC 827(AC)8-G	9	8	0,957	6	3	0,872	7	7	0,916
UBC 834(AG)8-YT	9	7	0,950	8	8	0,941	6	4	0,895
TOTAL	149	132	-	103	80	-	81	46	-
MÉDIA	10,6	9,4	0,956	7,3	5,7	0,918	5,8	3,3	0,866

R = Purina (A - adenina ou G - guanina) e Y = Pirimidina (C - citosina ou T - timina).

O número de bandas amplificadas variou de 81 a 149, com média de 10,6 para o cruzamento RB9419XRB99371; 7,3 para o cruzamento RB9364XRB93509 e 5,8 para o cruzamento RB855511XRB92579. O número de bandas polimórficas variou de 46 (55,3%) a 132 (86,5%), possivelmente relacionada à variabilidade genética dos cruzamentos.

Marcadores moleculares baseados em ISSR têm sido empregados com sucesso nas estimativas de variabilidade genética em espécies silvestres e cultivadas, e o número de bandas polimórficas utilizadas nessas análises é bastante variável (ESTOPA et al., 2006; SANTANA et al., 2011). Empregando *primers* ISSR em 42 genótipos de cana-de-açúcar (híbridos) da Índia subtropical verificou-se a divergência genética entre os genótipos e foi possível indicar genitores contrastantes. Das 79 bandas analisadas, 62 (78,48%) foram polimórficas (SRIVASTAVA e GUPTA, 2008).

Para verificar a qualidade de informação dos *primers* ISSR, estimou-se o conteúdo de informação polimórfica (PIC) que tem sido empregada para auxiliar na seleção dos melhores *primers*. Estes podem ser classificados como: muito informativo ($PIC > 0,5$), moderado ($PIC > 0,25$ e $< 0,5$) e pouco informativo ($PIC < 0,25$) (BOTSTEIN et al., 1980).

Os valores do PIC gerado pelos *primers* de ISSR foram considerados muito informativos para os cruzamentos; RB9419XRB99371, RB9364XRB93509 e RB855511XRB92579 com uma variação de 0,920 a 0,993 (MANY e DAT), de 0,871 a 0,972 (UBC809 e DAT), e de 0,678 a 0,916 (UBC 810 e UBC 827) para os respectivos cruzamentos.

Devarumath et al. (2012) encontraram para o valor do PIC uma variação de 0,11 a 0,45 com 13 *primers* para avaliarem a diversidade genética de 81 genótipos de cana-de-açúcar, sendo que foram de pouco a moderadamente informativos. Estas variações do valor do PIC entre os trabalhos incluem um conjunto de fatores como, o número de genótipos, quantidade de *primer*, condições de temperatura, entre outras (DA SILVA, 2001).

O polimorfismo genético e o PIC que foram observados entre as progênes e os genitores dos cruzamentos de cana-de-açúcar foram considerados altamente informativos.

Os três cruzamentos geraram 173 bandas polimórficas, a partir dos marcadores ISSR. Ao analisar os pares de todas as progênes e genitores a média da similaridade genética foi de 41,5%.

Esta média de similaridade genética encontrada pode ser atribuída à estrutura genética das cultivares modernas de cana-de-açúcar, caracterizadas pela presença de aneuploidia e poliploidia (SINGH et al., 2005). Almeida et al. (2009) estimaram valores máximos e mínimos de similaridade genética de 77% e 22%, entre quatorze cultivares de cana-de-açúcar, e constataram variabilidade genética, baseada na similaridade estimada a partir de marcadores ISSR.

A análise incluindo todas as progênes e genitores, conjuntamente, para os três cruzamentos resultaram na formação de três grupos bem definidos, sendo cada grupo representado por genótipos de um cruzamento. As progênes que apresentaram maior semelhança foram C3F12 e C3F13 (92%) e as mais divergentes C1F14 e C3F4 (17%). O grupo I é constituído exclusivamente por progênes do cruzamento RB9364XRB93509, enquanto o grupo II inclui apenas progênes do cruzamento RB9419XRB99371 e o grupo III por progênes do cruzamento RB855511XRB92579 (Figura 1).

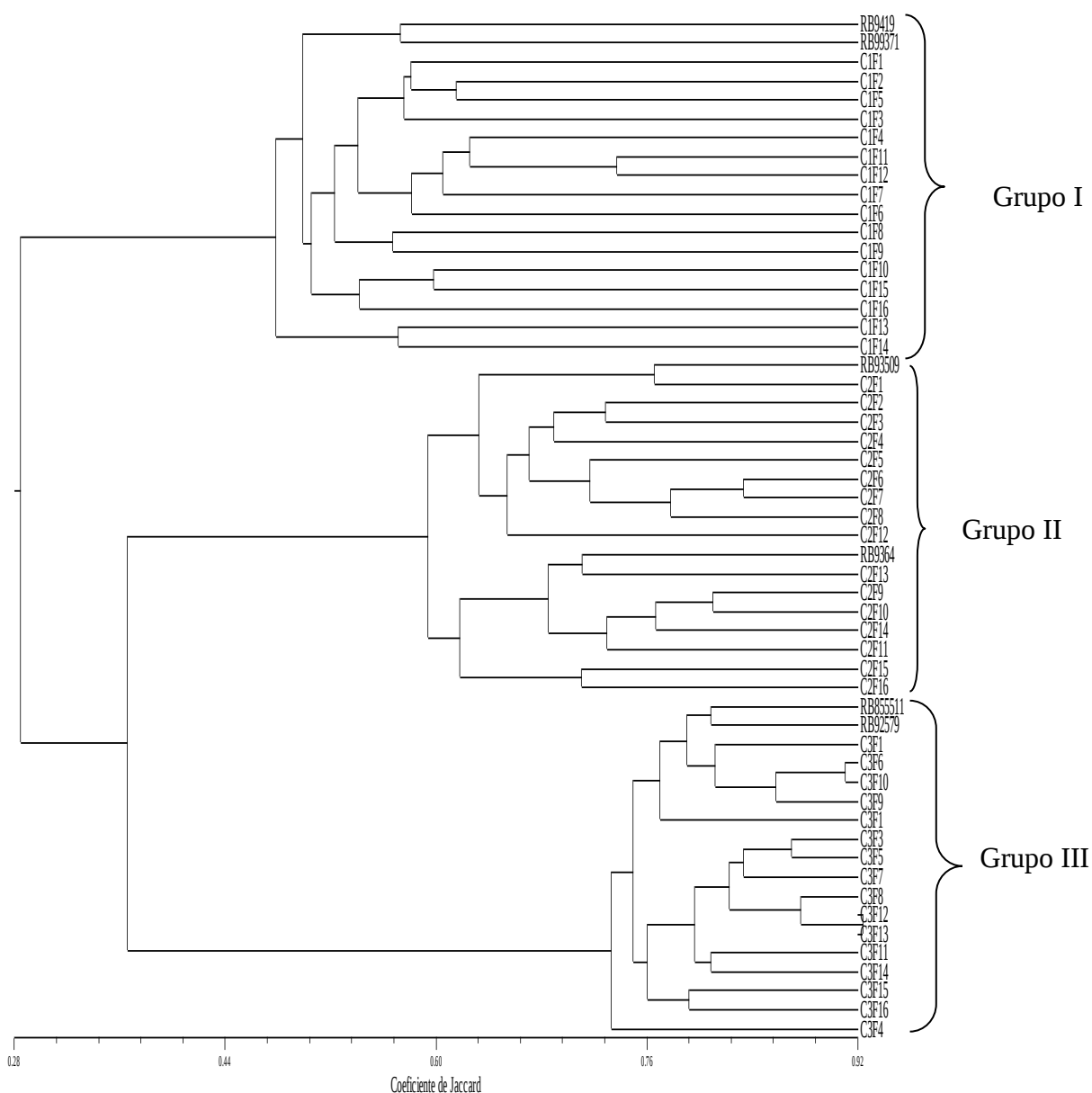


FIGURA 1. Dendrograma de similaridades genéticas intra e inter genótipos de cruzamentos biparentais de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) (RB9419XR99371, RB9364XR93509 e RB85511XR92579), definido pelo critério de agrupamento UPGMA, com base no coeficiente de Jaccard, empregando dados de marcadores ISSR.

Para verificar se o agrupamento das famílias apresentaria melhor resolução empregou-se a análise de componentes principais, com a dispersão gráfica da diversidade genética (Figura 2).

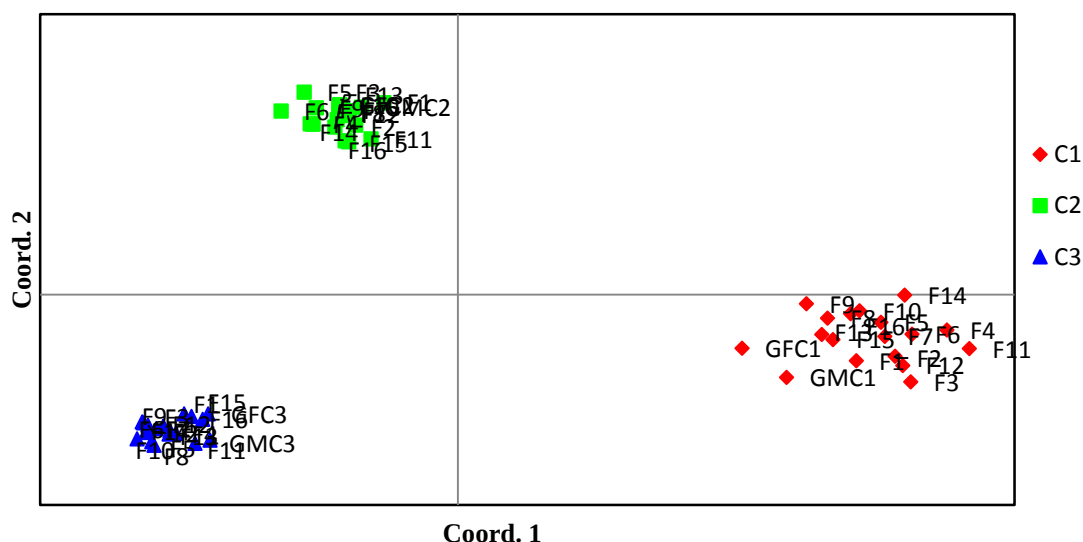


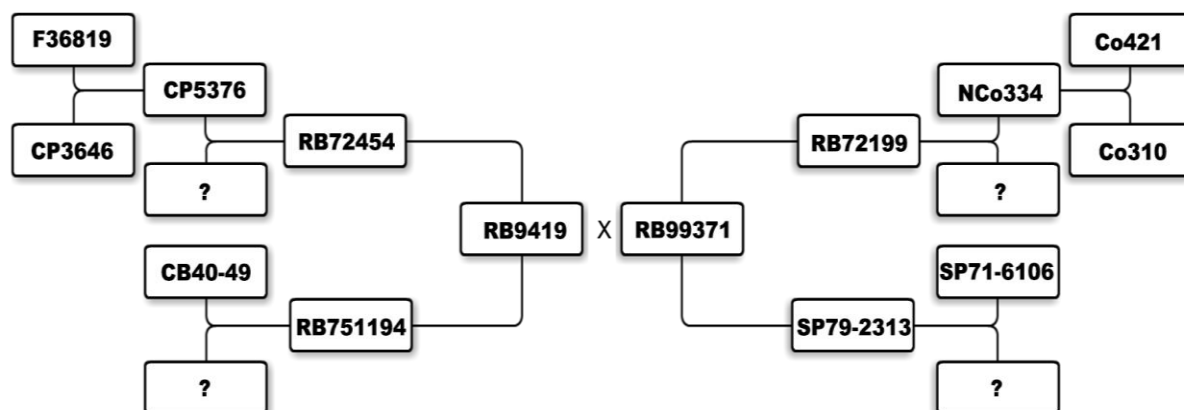
FIGURA 2. Dispersão gráfica pelo método da Análise das Coordenadas Principais considerando os três cruzamentos biparentais de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.), empregando dados de marcadores ISSR. Cruzamento RB9419XRB99371-(C1); Cruzamento RB9364XRB93509-(C2) e Cruzamento RB855511XRB92579-(C3). Genitor feminino (RB9419) do cruzamento C1 -(GFC1); Genitor masculino (RB99371) do cruzamento C1 - (GFC1); Genitor feminino (RB9364) do cruzamento C2-(GFC2); Genitor masculino (RB93509) do cruzamento C2 - (GFC2); Genitor feminino (RB855511) do cruzamento C3-(GFC3); Genitor masculino (RB92579) do cruzamento C3 - (GFC3); Progênies do cruzamento C1, C2 e C3 - (F1...F16).

Por meio da análise, os resultados condizem com os do dendrograma de similaridades genéticas (UPGMA). Os cruzamentos permaneceram separados, e não ocorreu proximidade entre as progênies de cada cruzamento. Observou-se que o cruzamento RB9364XRB93509 foi o mais divergente e os cruzamentos RB855511XRB92579 e RB855511XRB92579 foram mais similares dentro de cada cruzamento, o que pode refletir em menor variabilidade genética entre as progênies.

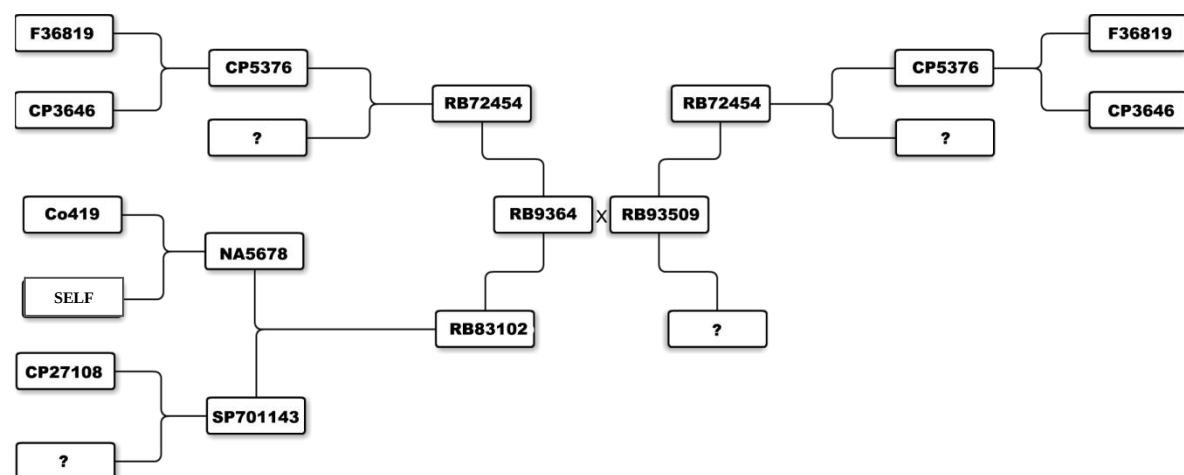
A genealogia dos genitores dos cruzamentos pode corroborar com esta similaridade genética existente entre as progênies de cada cruzamento (Figura 3).

No grupo I ao verificar a árvore genealógica os genitores não apresentam ancestrais com parentesco em comum. No entanto, têm a presença de policruzamentos com pais desconhecidos, isto possivelmente explica a similaridade genética (32,7%) dentro deste cruzamento, que contém maior diversidade genética.

Cruzamento C1: RB9364XR93509



Cruzamento C2: RB9419XR9371



Cruzamento C3: RB85511XR92579

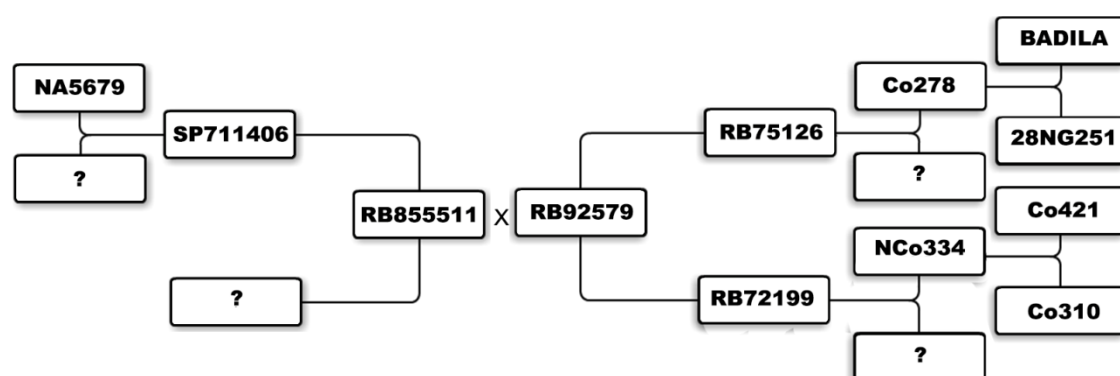


FIGURA 3. Genealogia dos genitores utilizados nos cruzamentos biparentais de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.). Fonte: PMGCA; Cacao:<https://cacao.com>.

No grupo II, ambos os genitores são descendentes do mesmo genitor feminino, sendo meio irmãos. O genitor feminino é descendente de cruzamento biparental e o genitor masculino de policruzamento, no qual se consegue obter mais combinações genéticas,

possibilitando maior variabilidade. Provavelmente, isto pode ter contribuído para uma menor similaridade (44,9%) neste cruzamento, ou seja, esta similaridade pode ser explicada pelo grau de parentesco dos genitores.

Para o grupo III houve maior similaridade de seus descendentes (76,8%), em relação aos outros dois cruzamentos, possivelmente por conta da hibridização dos seus genitores, a descendência do genitor feminino é proveniente de policruzamento e o genitor masculino de cruzamento biparental. Assim, as cultivares que fizeram parte do policruzamento podem ter ancestrais em comum, e possivelmente contribui neste caso para uma maior similaridade genética entre as progênes.

A quantificação da diversidade genética foi obtida por meio da análise de variância molecular (AMOVA) (Tabela 2), que permite verificar a existência significativa da diversidade das famílias, com variância genética total de 54% intra cruzamentos e 46% inter cruzamentos, indicando menor diversidade genética entre as progênes.

TABELA 2. Esquema de análise de variância molecular (AMOVA).

Fonte de variação	GL	QM	Componente Variância	Porcentagem	Probabilidade
Intra cruzamentos	2	395,32	20,970	54	0,001
Inter cruzamentos	51	17,86	17,865	46	
Total	53	-	38,835	100	

A proximidade entre estes cruzamentos, possivelmente é pelo grau de parentesco existente entre as cultivares. Em virtude disso, pode-se utilizar hibridações com genitores divergentes para aumentar a base genética e, portanto, alcançar novas combinações para maior diversidade genética dentro do cruzamento.

Diante destas informações, foi possível estimar a diversidade genética intra e inter dos cruzamentos biparentais, muitas medidas descritivas vêm sendo utilizadas, possibilitando entender a diversidade dos cruzamentos, entre elas o número de alelos, número de alelos efetivos, heterozigosidade esperada, índice de Shannon e número de alelos exclusivos (Tabela 3).

TABELA 3. Parâmetros de diversidade genética em cruzamentos biparentais de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp) com base nos *primers* de ISSR. Número de alelos (*Na*), Número de alelos efetivos (*Ne*), Heterozigosidade esperada (*He*); Índice de Shannon (*I*) e Número de alelos exclusivos (*Ae*).

Parâmetros	RB 9419 X RB99371	RB9364 X RB93509	RBRB855511 X RB92579	Média total
<i>Na</i>	1,60	1,04	0,74	1,13
<i>Ne</i>	1,47	1,33	1,20	1,33
<i>He</i>	0,27	0,18	0,11	0,19
<i>I</i>	0,41	0,27	0,16	0,28
<i>Ae</i>	48	12	03	21

O número de alelos dos cruzamentos RB9419XRB99371, RB9364XRB93509 e RB855511XRB92579 foram 1,60; 1,04 e 0,74, respectivamente com a média total de 1,13. O índice de diversidade gênica de Nei, também chamado de heterozigosidade foi de 0,27; 0,18 e 0,11, com média de 0,19, respectivamente.

Outro parâmetro de diversidade genética observado foi o índice de Shannon. Assim, é considerado para o índice de Shannon uma variação de 0 a 1, que indica quanto mais próximo do valor 1, maior será a diversidade (BOTREL et al., 2006).

Como base neste parâmetro, observou-se os seguintes valores de 0,41 para as progênes do cruzamento RB9419XRB99371, este o mais divergente geneticamente (67,3%). Para o cruzamento RB9364XRB93509 com 0,27 e para o cruzamento RB855511XRB92579 com 0,16 é o que apresentou menor diversidade (23,2%).

Essas variações detectadas para medidas descritivas entre os cruzamentos, principalmente para o cruzamento RBRB855511XRB92579, possivelmente é reflexo dos sucessivos ciclos de seleção, consequentemente, uniformidade dos caracteres genéticos para o desenvolvimento de novas cultivares, ou seja, mais homogêneas e com base genética mais estreita.

A ocorrência de alelos exclusivos ou alelos privados, que estão presentes em apenas um cruzamento foi verificada, para o cruzamento RB9419XRB99371 com 48, o cruzamento RB9364XRB93509 com 12 e o cruzamento RB855511XRB92579 apenas três alelos exclusivos. Estes alelos exclusivos podem ter contribuído com a diversidade genética do cruzamento RB9419XRB9937. No entanto, para este cruzamento se obteve maior diversidade genética em relação aos outros.

É importante perceber que para um programa de melhoramento genético os cruzamentos mais divergentes são os mais indicados para as próximas fases de seleções, pois indivíduos distantes geneticamente, a tendência é de compartilharem muitos genes e alelos diferentes, com maior probabilidade de manifestação da heterose (CRUZ et al., 2004; TABASUM et al., 2010).

5.4 Conclusão

Existem associações de diversidade genética intra e inter os cruzamentos biparentais de cana-de-açúcar, obtida por marcadores ISSR.

Existem agregações de parentesco, que podem ser explicadas pela diversidade genética obtida por marcadores ISSR.

5.5 Referências Bibliográficas

- ALMEIDA, C. M. A. de; LIMA, S. E. N. de; LIMA, G. S. A.; BRITO, J. Z. ; DONATO, V. M. T. S.; SILVA, M. V. Caracterização molecular de cultivares de cana-de-açúcar utilizando marcadores ISSR. **Ciência agrotécnica**, v. 33, Edição Especial, p. 1771 – 1776, 2009.
- BERILLI, A.P.C.G.; PEREIRA, M.G.; GONÇALVES, L.S.A.; CUNHA, K.S.; RAMOS, H.C.C.; FILHO, G.A.S.; AMARAL JÚNIOR, A.T. Use of molecular markers in reciprocal recurrent selection of maize increases heterosis effects. **Genetics and Molecular Research**, v.10, p. 2589-2596, 2011.
- BERDING, N.; HOGARTH, D.M.; COX, M.C. 2004. **Plant improvement of sugarcane**. p. 20–53. In J. Glynn (ed.) Sugarcane. Blackwell Science Ltd., Oxford.
- BOTREL, M. C. G.; SOUZA, A. M.; CARVALHO, D. ; PINTO, S. I. C.; MOURA, M. C. O.; ESTOPA, R. A. Caracterização genética de *Calophyllum brasiliense* Camb. em duas populações de mata ciliar. **Revista Árvore**, v.30, p.821-827, 2006.
- BOTSTEIN, D.; WHITE, R.L.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R.W. Construction of genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **American Journal of Human Genetics**, p. 32, p. 314–331, 1980.
- BRESSIANI, J.A.; BURNQUIST, W.L.; FUZATTO, S.R.; BONATO, A.L.; GERALDI, I.O. Combining ability in eight selected clones of sugarcane (*Saccharum* spp). **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.3, p.411-416, 2002.
- COSTA, M. L. M.; AMORIM, L. L. B.; ONOFRE, A. V. C.; MELO, L. J. O. T.; OLIVEIRA, M. B. M.; CARVALHO, R.; BENKO-ISEPPON, A. M. Assessment of Genetic Diversity in Contrasting Sugarcane Varieties Using Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) Markers. **American Journal of Plant Sciences**, v. 2, p. 425-432, 2011.
- CRUZ CD; REGAZZI AJ; CARNEIRO PCS. 2004. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa: UFV. 480p.
- CUNHA, K.S.; PEREIRA, M.G.; GONÇALVES, L.S.A.; BERILLI, A.P.C.G.; OLIVEIRA, E.C.; RAMOS, H.C.C.; AMARAL JÚNIOR, A.T. Full-sib reciprocal recurrent selection in the maize populations Cimmyt and Piranão. **Genetics and Molecular Research**, v. 11, p. 3398-3408, 2012.
- DEVARUMATH, R.M.; KALWADE, S.B.; KAWAR, P.G.; SUSHIR, K.V. Assessment of Genetic Diversity in Sugarcane Germplasm Using ISSR and SSR Markers. **Sugar Tech**, 14:334–344, 2012.
- ESTOPA, R. A.; SOUZA, A. M. de; MOURA, M. C. de; BOTREL, M. C. G.; MENDONÇA, E. G.; CARVALHO, D. Diversidade genética em populações naturais de candeia (*Eremanthus erythropappus* (JDC) MacLeish). **Scientia Forestalis**, n.70, p. 97-106, 2006.
- FERREIRA, F.M.; BARBOSA, M.H.P.; CASTRO, R.D.; PETERNELLI, L.A.; CRUZ, C.D. Effects of inbreeding on the selection of sugarcane clones. **Crop Breeding Applied Biotechnology**, v. 5, p.174-182, 2005.

HOFSETZ, K.; SILVA, M. A. Brazilian sugarcane bagasse: Energy and non-energy consumption. **Biomass Bioenergy**, v. 46, p. 564-573, 2012.

LANDELL, M. G. de A.; BRESSIANI, J. A. Melhoramento genético, caracterização e manejo varietal. In: LANDELL, M. G. de A. et al. **Cana-de-açúcar**. Campinas: IAC 2008. Cap. 5, p. 101-127, 149.

LUCIUS, A. S. F.; OLIVEIRA, R. A.; DAROS, E.; ZAMBON, J. L. C.; BESPALHOK FILHO, J. C.; VERISSIMO, M. A. A. Desempenho de famílias de cana-de-açúcar em diferentes fases no melhoramento genético via REML/BLUP. **Ciências Agrárias**, v. 35, p. 101-112, 2014.

MARCONI, T.G.; COSTA, E.A.; MIRANDA, H.R.; MANCINI, M.C.; SILVA, C. B.C.; OLIVEIRA, K. M.; PINTO, L.R.; MOLLINARI, M.; GARCIA, A. A. F.; SOUZA, A. Functional markers for gene mapping and genetic diversity studies in sugarcane. **Genetics Molecular Research**, v.4, p. 264, 2011.

NIENHUIS, J.; TIVANG, J.; SCKROCH, P.; SANTOS, J.B. Genetic relationships among cultivars and lines of lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) as measured by RAPD markers. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.120, p.300-306, 1995.

PEAKALL, R.; SMOUSE, P. Genetic analysis in excel. Population genetic software for teaching and research. **Molecular Ecology Notes**, p.288-295, 2006.

PEDROZO, C. A.; BARBOSA, M. H. P.; VILELA, M. D.; PETERNELLI, R. L. A.; COSTA, P. M. A.; SILVA, F. L. Eficiência de seleção em fases iniciais do melhoramento da cana-de-açúcar. **Revista Ceres**, v. 55, p. 1-8, 2008.

POWELL, W.; MORGANTE, C.; ANDRE, M.; HANAFEY, J.; VOGEL, T.; RAFALSKI, A. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP, and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. **Molecular Breeding**, v.2, p. 225-238, 1996.

ROCHA, A. M. C.; SANTOS, J. M.; BARBOSA, G. V. S.; CRUZ, M. M.; SOUZA, A. J.R.; RIBEIRO, C. A. G.; FERREIRA, J. L. C.; SILVA, P. P.; SANTOS, T. W. T.; NASCIMENTO, B. F. C. Quatro décadas de contribuição da Serra do Ouro para a agroindústria da cana-de-açúcar do Brasil, 2008. Anais, 9º Congresso Nacional da STAB, Maceió – AL, 2008. p. 532.

ROHLF, F.J. **Numerical taxonomy and multivariate analysis system**. New York. Version 2.1. 2001.

SANTANA, I. B. B.; OLIVEIRA, E. J.; SOARES FILHO, W. S.; RITZINGER, R.; AMORIM, E. P.; COSTA, M. A. P. C.; MOREIRA, R. F. C. Variabilidade genética entre acessos de Umbu-Cajazeira mediante análise de marcadores ISSR. **Revista Brasileira de Fruticultura**. v.33, p. 868-876, 2011.

SANTOS, R. C.; QUEIROZ, C. M.; BATISTA, V. G. L.; SILVA, C. R. C.; PINHEIRO, M. P. N.; GALVÃO FILHO, A. L. A.; MELO FILHO, P. A.; LIMA, L. M. Variabilidade de progênies F2 de amendoim geradas por meio de seleção de genitores ISSR-divergentes. **Revista Ciência Agronômica**, v. 44, p. 578-586, 2013.

SIDDIG, M. A. E.; DWEIKAT, I.; BAENZIGER, S.; HUSSEIN, A. A. E.; ELBASYONI, I. S. Genetic Diversity Among Sudanese Wheat Cultivars as Revealed by Molecular Markers. **Journal of Scientific Research**, v. 14, p.1135-1142, 2013.

SINGH, R.K.; SINGH, S. P.; MISHRA P.; SINGH, S.B. STMS markers for tagging high sugar genes in sugarcane. **Sugar Tech**, v. 7, p.74–76. 2005.

SRIVASTAVA, S.; GUPTA, P.S. Inter Simple Sequence Repeat Profile as a Genetic Marker System in Sugarcane. **Sugar Tech**, v.10, n.1, p.48-52, 2008.

STRINGER, J. K.; COX, M. C.; ATKIN, F. C.; WEI, X.; HOGARTH, D. M. Family selection improves the efficiency and effectiveness of selecting original seedlings and parents. **Sugar Tech**, v. 13, n. 1, p. 36-41, 2011.

TABASUM, S.; KHAN, F. A.; IGBAL, M. Z.; SAEED, A. DNA profiling of sugarcane genotypes using randomly amplified polymorphic DNA. **Genetics and Molecular Research**, v. 9, n. 01, p. 471-483, 2010.

WOLFE, A. D. ISSR techniques for evolutionary biology. **Methods Enzimology**, v.395, p.134-144, 2005.

6. ARTIGO 3. IDENTIFICAÇÃO DE HÍBRIDOS EM CRUZAMENTOS BIPARENTAIS DE CANA-DE-AÇÚCAR EMPREGANDO MARCADORES SSR

Periódico a ser submetido: Crop Breeding and Applied Biotechnology - CBAB

RESUMO

Em programas de melhoramento genético de cana-de-açúcar, a hibridação entre genótipos divergentes é essencial para a obtenção de progênies vigorosas, as quais podem ser uma cultivar. No entanto, as flores da cana-de-açúcar são hermafroditas, caso ocorra autofecundação em um nível elevado, pode influenciar na identidade genética da família de irmãos completos. Assim, este trabalho foi realizado com o objetivo de identificar híbridos em progênies provenientes de cruzamentos biparentais de cana-de-açúcar usando marcadores SSR. Foram analisados três cruzamentos RB9419XRB99371; RB9364XRB93509 e RB855511XRB92579 com 16 progênies cada, empregando oito pares de *primers* SSR. Para a identificação de parentais por marcadores SSR em cruzamentos controlados, verificou-se a presença de alelos presentes nas progênies e seus possíveis pais. As médias dos parâmetros de diversidade analisadas foram: número de alelos observados (0,872), número de alelos efetivos (1,213), índice de Shannon (0,128), heterozigosidade esperada (0,128) e número de alelos exclusivos (13,666). Com a análise do conteúdo de informação polimórfica (PIC) foi possível quantificar o polimorfismo genético de cada *primer* nos cruzamentos em estudo. Os *primers* SSR permitem a identificação de híbridos, e não detectaram a presença de progênies oriundas de autofecundação.

Palavras-chave: Parentais. Autofecundação. Microsatélites.

ABSTRACT

Título: Identification of hybrids in parental crosses of sugarcane ssr markers

In genetic breeding sugarcane programs, hybridization between divergent genotypes is essential for obtaining vigorous progeny, which may be a cultivar. However, the flowers of sugarcane are hermaphrodites, in case of self-fertilization in a high level, can influence the genetic identity of the family of full sibs. Thus, this study was to evaluate the identification of hybrids in progenies from bi-parental crossings. The crosses RB9419XRB99371, RB9364XRB93509 and RB855511XRB92579 and their progenies (16 each), employing eight pairs of SSR primers, and from the fragments patterns estimated the percentage of polymorphism, the genetic variability and genetic similarity (Sgij) by Jaccard coefficient, as well as, parameters of diversity as number of alleles, effective number of alleles, Shannon index, number of unique alleles, expected heterozygosity, percentage of polymorphic loci. There was the formation of three groups, each represented by a crossing. With the analysis of polymorphic information content (PIC) was to quantify the genetic polymorphism of each primer at intersections being studied. The SSR primers enable the identification of hybrid, however, specific sequences were identified that differentiate SSR in parental and hybrids thereof.

Key-words: Parental. Selfing. Microsatellites.

6.1 Introdução

Os programas de melhoramento genético de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) têm como principal estratégia a propagação sexuada para a obtenção de variabilidade genética, consequentemente, de progênes superiores, as quais passam por várias seleções para obter uma nova cultivar (SILVA, 2012). Este processo é realizado por hibridações entre genitores divergentes, que pode ser o cruzamento biparental, onde os genitores são conhecidos (HEINZ e TEW, 1987), nos quais é possível obter informações genéticas entre os genitores e as progênes, possibilitando visualizar caracteres entre gerações.

A cana-de-açúcar é uma planta alógama, em que a sua inflorescência é composta por flores completas, apresentando diferentes níveis de viabilidade polínica. Os genitores são classificados como feminino, masculino ou intermediário de maneira subjetiva com base na viabilidade polínica determinada por métodos de coloração dos grãos de pólen e as classes sexuais variam de acordo com taxas determinadas pelos programas de melhoramento (MCINTYRE e JACKSON, 2001).

Em virtude disto, em cruzamentos biparentais envolvendo parental feminino que produz pólen viável é possível a ocorrência de autofecundação, que pode influenciar na identidade genética da família, resultando na mistura de progênes por autofecundação e seus híbridos (CHEN et al., 2009). Se a ocorrência de autofecundação é significativa em cruzamentos controlados, a estratégia de se utilizar apenas características morfológicas para identificar híbridos e progênes resultantes de autofecundação, com base apenas no vigor das plantas em campo não é confiável, pois nem todo clone vigoroso pode ser oriundo de polinização cruzada. Além disso, as características morfológicas em grande parte sofrem influência do meio ambiente, mascarando o desenvolvimento da planta (WANG et al., 2009; TEW e PAN, 2010).

Para os Programas de Melhoramento o conhecimento da taxa de autofecundação de uma família de cruzamentos biparentais ou policruzamentos, é de grande interesse para permitir uma correta avaliação do comportamento da família e, consequentemente, da estimativa do valor de melhoramento dos genitores envolvidos no respectivo cruzamento (MCINTYRE e JACKSON, 2001).

O uso de ferramentas moleculares pode auxiliar na identificação da descendência dos híbridos verdadeiros em uma família. Estas não sofrem influência do ambiente, com isso as seleções nas fases iniciais dos programas de melhoramento podem acelerar o processo de obtenção dos genótipos superiores. Desta forma, reduzir os gastos da manutenção das populações experimentais e aumentar a variabilidade genética dos cruzamentos entre

genitores é de fundamental importância na identificação de combinações híbridas com maior heterozigosidade, pois evita a redução quanto aos caracteres quantitativos (MUNIZ et al., 2002; MARCONI et al., 2011).

Os marcadores do tipo microssatélites ou SSR contribui para o desenvolvimento de novas análises e a sua utilização no melhoramento genético para várias culturas agrícolas, pois estes marcadores orientam os cruzamentos entre cultivares, permite o conhecimento do genoma e facilitam a identificação de características agronômicas desejáveis (AITKEN et al., 2005). Cada par de *primers* SSR pode ser usado especificamente para uma sequência na identificação de progênies.

Aplicando *primers* de SSR, em duas populações de irmãos completos (CIMMYT e Piranão) de milho (*Zea mays* L.), a população de Piranão apresentou ganhos genéticos ao longo dos ciclos de seleção, além destes marcadores auxiliarem na detecção do loco (*umc1739*) com maior número de alelos privados, os quais podem ser úteis na identificação de cultivares (CUNHA et al., 2014).

Outras pesquisas para identificação de progênies oriundas de autofecundação contaminantes e híbridos verdadeiros em cruzamentos biparentais e policruzamentos por marcador SSR têm sido utilizadas, visando à obtenção de clones superiores com caracteres de interesse provenientes de seus ancestrais (TEW e PAN, 2010; SANTOS et al., 2014; XAVIER et al., 2014).

Neste trabalho, o objetivo foi identificar híbridos em progênies provenientes de cruzamentos biparentais de cana-de-açúcar usando marcadores SSR.

6.2 Material e Métodos

6.2.1 Material vegetal

Foram empregadas 16 progênes F_1 de três cruzamentos: RB9419XRB99371; RB9364XRB93509 e RB855511XRB92579. O método de hibridização entre os genitores foi realizado de acordo com os procedimentos padrão do programa de melhoramento genético da RIDESA (Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroenergético) (ROCHA et al., 2008). As cariopses obtidas foram armazenadas em câmara fria. De cada um dos cruzamentos foram reservadas cinco gramas de cariopses e estas foram semeadas em bandejas plásticas, previamente identificadas e após 50 dias as plantas foram transplantadas em campo.

6.2.2 Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Nienhuis et al. (1995) com modificações.

De cada progênie foram utilizados 2g de folhas novas para maceração com o auxílio de almofariz e pistilo, onde se adicionou 10 mL de tampão CTAB 2% (2% de CTAB, 100mM de Tris (pH8,0), 20mM de EDTA (pH 8,0), 1,4M de NaCl e 1% de PVP) e 20 μ L de β -mercaptoetanol, para retardar a oxidação de metabólitos secundários. O macerado foi transferido para tubos de ensaio e levados ao banho-maria a 65°C por 60 minutos.

Após esse período de incubação, as amostras foram purificadas com a adição de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) e centrifugados a 7.000 Xg por 30 minutos. O sobrenadante obtido foi micropipetado e a ele adicionado álcool:acetato de amônio, mantido a -20°C *overnight* para precipitação do DNA. As amostras foram centrifugadas a 14.000 Xg por 10 minutos e em seguida, o álcool: acetato de amônio foi descartado e substituído por etanol, deixando-se 10 minutos em temperatura ambiente. Uma nova centrifugação foi realizada por 10 minutos a 14.000 Xg , sendo assim possível descartar o sobrenadante e secar o precipitado em temperatura ambiente. Após, o DNA foi solubilizado em TE (1mM deTris e 0,1mM de EDTA).

A concentração de DNA de cada amostra foi determinada em fluorímetro (DQ300 Quick Reference Guide).

6.2.3 Reação de SSR

As reações de SSR foram realizadas com 18 µL do volume final, contendo: 2 µM de DNA [5ng/µL], 2 µM de cada par de *primer* [2µM] e 12 µL do mix TopTaq Master Mix Kit (Qiagen).

A amplificação consistiu de uma temperatura inicial de 94°C por 5 minutos, seguida por 37 ciclos de amplificação em 94°C por 40 segundos. As temperaturas de anelamento específicas para cada par de *primer* foram: para o SMCS97CS (64°C), SCA06 (54°C), SCA07 (54°C), SCA08 (63°C), SCA10 (62°C), SCB03 (63°C), SCB07 (54°C), e SCC01 (56°C) por 40 segundos, 72°C por 40 segundos e 72°C por 2 minutos.

Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose 3% em tampão TBE 0,5X, a 100 V por 1 hora e 55 minutos e corados com GelRed *nucleic acid slain*. Posteriormente, os géis foram fotografados sob luz UV, em um transilluminator digital (Benchtop). O tamanho dos fragmentos amplificados foram estimados por comparação com marcador molecular de 300 kb DNA Ladder, Promega.

6.2.4 Análise dos dados SSR

Os marcadores SSR são considerados codominante, mas foram analisados como marcadores dominantes. Por conta do genoma complexo da cana-de-açúcar, este apresenta alta poliploidia, o que muitas vezes tem dificultado a distinção dos alelos de cromossomas homólogos e a visualização entre o heterozigoto ou homozigoto quando o mesmo possui alelos iguais (CORDEIRO et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2009). A partir disso foi construída uma matriz binária, quanto à presença (1) ou ausência (0) de bandas (alelos). Os dados binários foram utilizados para realizar as análises.

O conteúdo de informação de polimorfismos (PIC) de cada par de *primer* foi calculado baseado no número de alelos (bandas) detectados por determinado loco e a frequência relativa de cada alelo no conjunto dos genótipos analisados, com base na equação:

$$PIC = 1 - \sum p_{ij}^2,$$

Em que:

p_i é a frequência do i -ésimo alelo marcador j (POWELL et al., 1996).

O programa STRUCTURE (PRITCHARD et al., 2000) baseado em estatística bayesiana foi utilizado alternativamente para inferir o número de grupos (k). Para definição

do k mais provável em relação aos propostos foram utilizados os critérios propostos por Evano et al. (2005).

As progênie foram analisadas pelo perfil de amplificação dos parentais e classificadas como: híbridos verdadeiros, autofecundação, ou contaminantes. A presença de alelos (bandas) de ambos os genitores presentes na progênie indicaram que o indivíduo é um híbrido verdadeiro. Se a progênie apresentar apenas alelos do genitor feminino foram classificadas como resultantes de autofecundação. A presença de alelos na progênie que não estavam presente nos genitores, a descendência foi considerada como resultante de pólen contaminante ou mistura de sementes, e assim a progênie foi definida como contaminante (SANTOS et al., 2014; TEW e PAN, 2010).

Para a caracterização da diversidade genética empregou-se o Programa Genalex 6.3 (PEAKALL e SMOUSE, 2006), analisando os seguintes parâmetros: número de alelos observados (N_a), número de alelos efetivos (N_e), índice de Shannon (I), heterozigosidade esperada de Nei (H_e) (1973) e número de alelos exclusivos (A_e).

6.3 Resultados e discussão

Para as análises de parentesco e diversidade genética com marcador SSR foram inicialmente usados oito pares de *primers* SSR que apresentam 37, 31 e 25 alelos para os cruzamentos RB9419 X RB99371, RB9364 X RB93509 e RB855511 X RB92579 respectivamente, com uma média de 2,06 alelos por indivíduo. As bandas variaram em média de 128 a 378 pares de bases (pb), para os três cruzamentos de cana-de-açúcar (Tabela 1).

TABELA 1 – Relação do número de bandas amplificada para cada *primer* SSR em cruzamentos biparentais de cana-de-açúcar (*Saccharum* ssp). *Primers* SSR, Motif dos *primers*, Número total de alelos entre os genótipos (NTA), Número de alelos polimórficos entre os genótipos (NAP), Conteúdo de informação polimórfica (PIC), Heterozigosidade esperada (*He*) e Intervalo de pares de base dos alelos (*pb*).

<i>Primers</i>	Motif	RB9419 X RB99371				RB9364 X RB93509				RB855511 X RB92579				Intervalo (<i>pb</i>)
		NTA	NAP	PIC	He	NTA	NAP	PIC	He	NTA	NAP	PIC	He	
SMCS97CS	(AG)31	6	6	0,966	0,18	4	3	0,842	0,07	5	5	0,961	0,145	128-300
SCA06	(TG)12	4	4	0,971	0,135	4	4	0,938	0,134	3	2	0,848	0,071	195-376
SCA07	(AC)7	3	3	0,960	0,223	1	0	0,00	0,00	1	0	0,000	0,00	200-275
SCA08	(CG)7	3	3	0,962	0,224	3	3	0,801	0,194	1	0	0,000	0,00	220-300
SCA10	(GA)7	4	4	0,934	0,186	3	3	0,826	0,131	3	2	0,811	0,100	195-300
SCB03	(CAG)5	3	3	0,951	0,142	3	3	0,945	0,137	1	0	0,000	0,00	270-330
SCB07	(CGA)8	9	7	0,972	0,204	10	6	0,929	0,187	9	4	0,937	0,10	150-300
SCC01	(GATA)14	5	5	0,974	0,151	3	3	0,937	0,133	2	2	0,774	0,093	290-378
Média	-	4,6	4,4	0,961	-	3,9	3,1	0,777	-	3,1	1,9	0,541	-	-
Total	-	37	35	-	-	31	25	-	-	25	15	-	-	-

O número de alelos polimórficos variou de 15 a 35, com um polimorfismo de 47,2 a 97,2% para os cruzamentos.

Esse valor é similar ao estimado por Devarumath et al. (2012) que, analisaram a variabilidade genética entre 81 genótipos de cana-de-açúcar, a partir de 27 pares de *primers* SSR, com amplificação de 79 alelos, dos quais 76 foram alelos polimórficos (96,2%), com uma média de 2,8 alelos por loco.

O alto nível de polimorfismo detectado pode estar relacionado à natureza do genoma da cana-de-açúcar, uma espécie poliplóide (COSTA et al., 2011).

O valor do conteúdo de informação polimórfica (PIC) é um indicador de qualidade informativa de cada par de *primer*. O PIC está relacionado com o número de alelos e o número de genótipos em estudo (RAJENDRAN et al., 2014). Este pode ser classificado como

altamente informativo quando o valor de PIC for maior do que 0,5, moderadamente informativo quando o valor varia de 0,5 a 0,25 e não informativo quando o seu valor é inferior a 0,25 (BOTSTEIN et al., 1980).

Os resultados do PIC para o primeiro cruzamento (RB9419XRB99371), esta dentro da classe de muito informativo para todos os pares de *primers*, com média de 0,961. Para a maioria dos *primers* utilizados nos cruzamentos RB9364XRB93509 e RB9855511XRB92579 o PIC foi considerado informativo com média de 0,777 e 0,541, respectivamente. No entanto, os *primers* SCA07, SCA08 e SCB03 apresentaram o valor do PIC zero, indicando perfis monomórficos.

A heterozigosidade por *primer* no primeiro cruzamento variou de 0,135 a 0,224. Para o cruzamento RB9364XRB93509 houve um *primer* (SCA07) com ausência de heterozigotos. Para o último cruzamento RB9855511XRB92579, três pares de *primers* (SCA07, SCA08 e SCB03) não foram heterozigotos. Por se tratarem de cruzamentos com genótipos aparentados, baixos índices ou mesmo ausências de heterozigosidade, podem ocorrer para a maioria dos locos nas progênies avaliadas neste estudo (CRESTE et al., 2010). Assim, ocorrem variações entre os resultados, possivelmente por conta das diferenças entre os genótipos.

Dos oito pares de *primers* SSR analisados, cinco (SMCS97CS, SCA06, SCA10, SCB07 e SCC01) foram considerados altamente informativos para os três cruzamentos de acordo com o PIC, por apresentarem locos passíveis de interpretação, para a identificação de híbridos verdadeiros e contaminantes.

A eficiência de discriminação de apenas dois pares de *primers* SSR foi capaz de identificar 66 acessos pertencentes ao gênero *Saccharum* (*S. officinarum*, *S. spontaneum*, *S. sinense*) (CORDEIRO et al., 2003). Esta diferença de eficiência pode ter ocorrido por conta das diferenças nos genótipos avaliadas (DA SILVA, 2001).

Diante destas informações desses *primers*, foi possível estimar a ocorrência de alelos exclusivos ou alelos privados, ou seja, aqueles que estão presentes em cada genitor distintamente (Tabela 2). Entre os alelos identificados para os genitores femininos (RB9419, RB9364 e RB855511) foram verificados seis, três e dois alelos, e para os genitores masculinos (RB99371, RB93509 e RB92579) foram dois e três alelos, respectivamente.

TABELA 2. As cultivares usadas com genitores (feminino e masculino), classificação do sexo de cada uma, número de alelos exclusivos em genitor, número de alelos em comuns, porcentagens de híbridos verdadeiros e contaminantes identificado em cada cruzamento.

Genitores		Alelos exclusivos		Alelos comuns	Híbridos verdadeiros (%)	Contaminantes (%)
Feminino	Masculino	Feminino	Masculino			
RB9419	RB99371	6	2	9	29	71
RB9364	RB93509	3	3	10	74	26
RB855511	RB92579	2	3	11	73	27

Os alelos exclusivos podem ser utilizados como marcadores dos indivíduos dentro do cruzamento e a depender da característica a ser manifestada por este, tornando-se um aspecto importante para os programas de melhoramento visando identificar este alelo em outros indivíduos. Assim, identificar genótipo a partir deste é possível, e por hibridações ocorre à transferência do alelo para os descendentes (SIGNORINI et al., 2013).

A presença de alelos comuns também foi detectada no genitor feminino e masculino de cada cruzamento. O cruzamento RB9419XRB99371 com nove alelos em comum, o cruzamento RB9364XRB93509 e RB855511XRB92579 observou-se 10 e 11 alelos comuns entre os genitores, respectivamente. Os alelos herdados pelas progênes são da união dos gametas dos seus possíveis genitores (pais). Caso a progênie apresente alelos apenas do genitor feminino, está será resultante de autofecundação, o que não foi observado neste trabalho.

As transmissões de alelos entre cada cruzamento foi constatada por marcadores SSR, os quais podem ser úteis para identificar os híbridos verdadeiros. O perfil de amplificação gerado pelos cinco pares de *primers* SSR foi possível observar os alelos dos genitores presentes nas progênes, chamados de híbridos verdadeiros.

Para dois cruzamentos, a segregação dos alelos dos parentais foi observada na maioria das progênes, para os cruzamentos RB9364XRB93509 e RB9855511XRB92579 foram constatados 74 e 73% de híbridos verdadeiros, respectivamente. As demais foram contaminantes. Para o cruzamento RB9419XRB99371 identificou-se 29% de híbridos verdadeiros, descendentes de ambos os genitores e 73% foram classificadas como progênes contaminantes.

A ocorrência de progênes contaminantes foi verificada por Santos et al. (2014) ao analisarem a paternidade dos cruzamentos RB863129XSP93-3500 com 19 progênes e SP832847XRB98710 com 20 progênes, encontraram uma variação de 15,79 a 80% para de progênes oriundas de contaminação, ou seja, de pólen desconhecido. Em outro trabalho, com

policruzamentos também verificaram 23,95% de progênies contaminadas, com pólen de genitores desconhecidos. Não se sabe o motivo, pode ter ocorrido antes do emparelhamento dos pais, ou a falta de isolamento das panículas durante a maturação das cariopses (TEW e PAN, 2010).

Assim, os marcadores SSR possibilitaram a confirmação da descendência de progênies de cana-de-açúcar. A estrutura genética dos 54 indivíduos foi analisada por meio do programa STRUCTURE 2.3 que determinou o número de grupos (k), o mais provável em relação ao proposto com valores de ΔK . Através do critério usado, o número de grupos estimado foi igual a quatro (Figura 1).

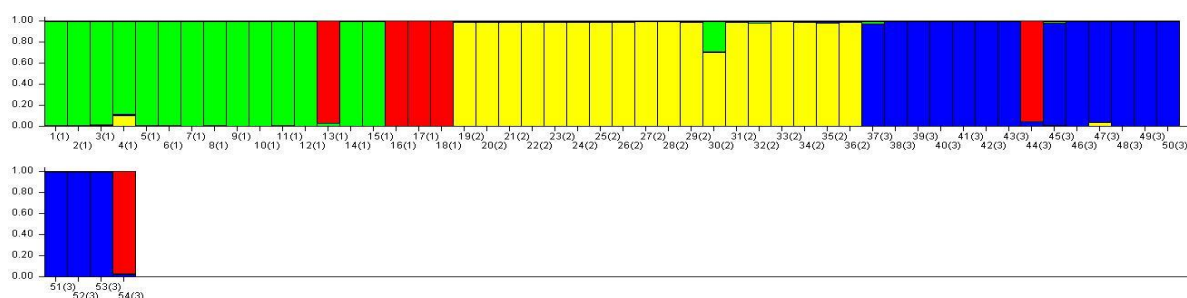


FIGURA 1. Distribuição para genótipos obtidos de três cruzamentos biparentais de cana-de-açúcar com pares de *primers* SSR (SMCS97CS, SCA06, SCA10, SCB07 e SCC01) classificados como mais informativos ($\Delta K=4$). Progênies e genitores são representados pelas barras verticais coloridas. A cor indica o cruzamento: verde RB9419XRB99371, amarela RB9364XRB93509, azul RB855511XRB92579 e a vermelha outra base genética. Cores diferentes no mesmo indivíduo indicam a porcentagem do genoma compartilhado com cada grupo.

Verificou-se a formação de três grupos, o primeiro (verde) representa os genitores e a maioria das progênies do cruzamento RB9419XRB99371, o segundo (amarelo) com o cruzamento RB9364XRB93509 e o terceiro (azul) com os genitores e 14 progênies do cruzamento RB855511XRB92579. Os resultados permitiram a identificação da relação de parentesco entre os genitores e as progênies de cada cruzamento. Um quarto grupo (vermelho) menor foi formado por seis progênies, sendo quatro progênies (F11, F14, F15 e F16) do primeiro cruzamento e duas (F6 e F16) do último cruzamento, possivelmente com características mais divergentes em relação às outras progênies.

Com isso a estrutura genética dos três cruzamentos foi definida, o primeiro cruzamento RB9419XRB99371 apresenta maior variação na sua estrutura. Observado-se o resultado anterior para o PIC e a identificação de progênies contaminantes obteve maiores resultados, quando comparado com os outros dois cruzamentos.

Na busca pela quantificação da diversidade genética em famílias, outras medidas descritivas vêm sendo utilizadas, possibilitando inferir sobre a diversidade da família, entre elas o número de alelos efetivos que variou de 1,287 a 1,136; o índice de Shannon com variação de 0,270 a 0,121 (Tabela 3).

TABELA 3. Parâmetros de diversidade genética em cruzamentos biparentais de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp) com base nos *primer* de SSR. Número de alelos (Na), Número de alelos efetivos (Ne), Índice de Shannon (I) Heterozigosidade esperada (He) e Número de Alelos exclusivos (Ae).

Parâmetros	RB 9419XRB99371	RB9364XRB93509	RBRB855511XRB92579	Média total
<i>Na</i>	1,125	0,844	0,625	0,872
<i>Ne</i>	1,287	1,216	1,136	1,213
<i>I</i>	0,270	0,192	0,121	0,194
<i>He</i>	0,177	0,128	0,080	0,128
<i>Ae</i>	22	12	07	13,666

O índice de Shannon varia de 0 a 1, e considera-se que, quanto mais próximo o valor for de zero, mais baixas são as diversidades (BOTREL et al., 2006).

A heterozigosidade esperada (*He*) nos cruzamentos RB9419XRB99371, RB9364XRB93509 e RBRB855511XRB92579 foi de 0,177; 0,128 e 0,080, respectivamente, com média de 0,128.

Em estudo realizado em acessos de melancia Mujaju et al. (2013) se encontrou valores de heterozigosidade com uma média 0,10, valor inferior ao encontrado neste estudo. A heterozigosidade entre duas populações de cevada, foi de 0,4333 para cultivares comerciais e 0,5098 para acessos selvagens, indicando uma moderada diversidade genética entre os acessos selvagens (ZHANG et al., 2014).

Esses valores para os parâmetros da diversidade podem ser atribuídos ao número de indivíduos analisados e, conseqüentemente, um aumento no tamanho da amostra pode resultar em valores mais elevados (NYBOM, 2004).

Além, do efeito endogâmico que pode ocorrer pelo processo de hibridação entre genótipos aparentados em cana-de-açúcar, o que revela também o aumento da homozigose dentro das famílias. No cruzamento RB9419XRB9937 observou-se mais progênes contaminantes em relação aos outros dois cruzamentos, o que possivelmente influenciou na diversidade genética encontrada.

O valor do número de alelos exclusivos (*Ae*) ou privados encontrados foi de 22, 12 e sete para os cruzamentos RB9419 X RB99371, RB9364 X RB93509 e RBRB855511 X RB92579, respectivamente. Estes alelos, possivelmente estão influenciando na variabilidade genética das famílias em estudo.

Desta forma, um dos objetivos de um programa de melhoramento é obter informações genéticas das famílias que são compostas por clones superiores, mas para estimar corretamente a variabilidade genética dentro das famílias, os indivíduos têm que apresentarem a mesma descendência (WANG et al., 2009).

6.4 Conclusão

Os marcadores SSR permite a identificação de progeneis contaminantes e híbridos verdadeiros em cruzamentos biparental.

6.5 Referências Bibliográficas

- AITKEN, K.S.; JACKSON, P.A.; MCINTYRE, C.L. A combination of AFLP and SSR markers provides extensive map coverage and identification of homo (eon) logous linkage groups in a sugarcane cultivar. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 110, p.789–801, 2005.
- BERDING, N.; HOGARTH, M.; COX, M. Sugarcane. In: Plant Improvement of Sugarcane (James G, ed.). Blackwell Science, Oxford, p.2-53, 2004.
- BRESSIANI, J.A.; BURNQUIST, W.L.; FUZATTO, S.R.; BONATO, A.L.; GERALDI, I.O. Combining ability in eight selected clones of sugarcane (*Saccharum* spp). **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.3, p.411-416, 2002.
- CHEN, P.H.; PAN, Y.B.; CHEN, R.K.; XU, L.P.; CHEN, Y.Q. SSR marker-based analysis of genetic relatedness among sugarcane cultivars (*Saccharum* sp. hybrids) from breeding programs in China and other countries. **Sugar Tech**, v. 11, p.347-354, 2009.
- CORDEIRO, G.M.; PAN, Y.B.; HENRY, R. J. Sugarcane microsatellites for the assessment of genetic diversity in sugarcane germplasm. **Plant Science**, n. 165, p. 181-189, 2003.
- COSTA, M. L. M.; AMORIM, L. L. B.; ONOFRE, A. V. C.; MELO, L. J. O. T.; OLIVEIRA, M. B. M.; CARVALHO, R.; BENKO-ISEPPON, A. M. Assessment of Genetic Diversity in Contrasting Sugarcane Varieties Using Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) Markers. **American Journal of Plant Sciences**, v. 2, p. 425-432, 2011.
- DEVARUMATH, R.M.; KALWADE, S.B.; KAWAR, P.G.; SUSHIR, K.V. Assessment of Genetic Diversity in Sugarcane Germplasm Using ISSR and SSR Markers. **Sugar Tech**, 14:334–344, 2012.
- EVANO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. *Molecular Ecology*, v.14, p.2611–2620. 2005.
- GARRIS, A.J.; TAI, T.H.; COBURN, J.; KRESOVICH, S.; MCCOUCH, S. Genetic structure and diversity in *Oryza sativa* L. **Genetics**, v.169, p.1631–1638, 2005.
- HEINZ, D.J.; TEW, T.L. (1987) **Hybridization procedures**. In DJ Heinz (ed.) Sugarcane improvement through breeding. Elsevier, Amsterdam p.313–342.
- NYBOM, H. “Comparison of Different Nuclear DNA Markers for Estimating Intraspecific Genetic Diversity in plants,” **Molecular Ecology**, v.13, p. 1143-1155, 2004.
- KALIA, R.K.; RAI, M.K.; KALIA, S.; SINGH, R.; DHAWAN, A.K. Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. **Euphytica**, v. 177, p. 309-334, 2011.
- MARCONI, T.G.; COSTA, E.A.; MIRANDA, H.R.; MANCINI, M.C.; SILVA, C. B.C.; OLIVEIRA, K. M.; PINTO, L.R.; MOLLINARI, M.; GARCIA, A. A. F.; SOUZA, A. Functional markers for gene mapping and genetic diversity studies in sugarcane. **Genetics Molecular Research**, v.4, p. 264, 2011.
- Mc INTYRE, C.L.; JACKSON, P.A. Low level of selfing found in a sample of crosses in Australian Sugarcane Breeding Programs. **Euphytica**, v.117, p.245-249. 2001.

MUJAJU,C.; SEHIC, J.; NYBOM, H. Assessment of EST-SSR Markers for Evaluating Genetic Diversity in Watermelon Accessions from Zimbabwe. **American Journal of Plant Sciences**, v. 4, p.1448-1456, 2013.

MUNIZ, F. R. S.; MAURO, A. O. DI. ; UNÊDA-TREVISOLI, S. H.; OLIVEIRA. J. A.; BÁRBARO, I. M.; ARRIEL, N. H. C.; COSTA, M. M. Parâmetros Genéticos e Fenotípicos em Populações Segregantes de Soja. **Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibrosas**, v. 6, n. 3, p. 609-616, 2002.

NIENHUIS, J.; TIVANG, J.; SCKROCH, P.; SANTOS, J.B. Genetic relationships among cultivars and lines of lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) as measured by RAPD markers. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.120, p.300-306, 1995.

OLIVEIRA, K.M.; PINTO, L. R.; MARCONI, T. G.; MOLLINARI, M.; ULIAN, E. C.; CHABREGAS, S. M. ; FALCO, M. C.; BURNQUIST, W.; GARCIA, A. A.; SOUZA, A. P. Characterization of new polymorphic functional markers for sugarcane. **Genome**,v. 52, p. 191-209, 2009.

PAN,Y.B. Highly polymorphic microsatellite DNA markers for sugarcane germplasm evaluation and variety identity testing. **Sugar Tech**, v. 8, p. 246-256, 2006.

PEAKALL, R.; SMOUSE, P. Genetic analysis in excel. Population genetic software for teaching and research. **Molecular Ecology Notes**, p.288-295, 2006.

POWELL, W.; MORGANTE, C.; ANDRE, M.; HANAFEY, J.; VOGEL, T.; RAFALSKI, A. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP, and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. **Molecular Breeding**, v.2, p. 225-238, 1996.

PRITCHARD, J.K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, v.155, p.945-959, 2000. SANTOS, J. M;BARBOSA, G.V.S.; RAMALHO NETO, C. E.; ALMEIDA, C. Efficiency of biparental crossing in sugarcane analyzed by SSR markers.**Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 14, p. 102-107, 2014.

ROCHA, A. M. C.; SANTOS, J. M.; BARBOSA, G. V. S.; CRUZ, M. M.; SOUZA, A. J.R.; RIBEIRO, C. A. G.; FERREIRA, J. L. C.; SILVA, P. P.; SANTOS, T. W. T.; NASCIMENTO, B. F. C. Quatro décadas de contribuição da Serra do Ouro para a agroindústria da cana-de-açúcar do Brasil, 2008. Anais, 9º Congresso Nacional da STAB, Maceió – AL, 2008. p. 532.

SIGNORINI T; RENESTO E; MACHADO MFPS; BESPALHOK DN; MONTEIRO ER. Diversidade genética de espécies de Capsicum com base em dados de isozimas. **Horticultura Brasileira**, n. 31, pg. 534-539, 2013.

SILVA, D.C.; DUARTE FILHO, L.S.C.; SANTOS, J.M.; BARBOSA, G.V.; ALMEIDA, C. DNA fingerprinting based on simple sequence repeat (SSR) markers in sugarcane clones from the breeding program RIDESA. **African Journal of Biotechnology**, v.11, p. 4722-4728, 2012.

TEW, T. L.; PAN, Y. B. Microsatellite (*Simple Sequence Repeat*) Marker–based Paternity Analysis of a Seven-Parent Sugarcane Polycross. **Crop Science**, v.50, p.1401-1408, 2010.

WANG, X.H.; YANG, Q.H.; LI, F.S.; HE, L.L.; HE, S.C. Molecular identification of *Saccharum* spp $\times$ *Erianthus fulvus* hybrids using sequence-characterized amplified region markers **Crop Science**, v. 49, p. 864-870, 2009.

XAVIER, M. A.; PINTO, L. R.; Fávero, T. M.; PERECIN, D.; CARLINI-GARCIA, L.A.; LANDELL, M.G.A. Paternity identification in sugarcane polycrosses by using microsatellite markers. **Genetics and Molecular Research**, n.13, v. 1, p.2268-2277, 2014.

ZHANG, M.; MAO, W.; ZHANG, G.; WU, F. Development and Characterization of Polymorphic EST-SSR and Genomic SSR Markers for Tibetan Annual Wild Barley. **PLoS ONE**, v.9, p.4, 2014.