

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE
MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**FISIOLOGIA DO FLORESCIMENTO E VIABILIDADE DO
GRÃO-DE-PÓLEN DA CANA-DE-AÇÚCAR (*Saccharum*
sp.).**

Maria Letícia Guindalini Melloni

Engenheira Agrônoma

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

2012

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE
MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**FISIOLOGIA DO FLORESCIMENTO E VIABILIDADE DO
GRÃO-DE-PÓLEN DA CANA-DE-AÇÚCAR (*Saccharum* sp.).**

Maria Letícia Guindalini Melloni

Orientadora: Dr.ª Luciana Rossini Pinto

Co-orientador : Dr. Maximiliano Salles Scarpari

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas).

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Fevereiro-2012

M527f Melloni, Maria Letícia Guindalini
Fisiologia do florescimento e viabilidade do grão-de-pólen da
cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.)/ Maria Letícia Guindalini Melloni – –
Jaboticabal, 2012
x, 78 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2012

Orientadora: Luciana Rossini Pinto

Banca examinadora: Rinaldo Cesar de Paula, José Antônio
Bressiani

Bibliografia

1. Inflorescência, 2. Marcador molecular, 3. Fotoperíodo, 4.
Hibridação. I. Título. II. Jaboticabal - Faculdade de Ciências Agrárias e
Veterinárias.

CDU 631.52:633.61

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da
Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de
Jaboticabal.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

MARIA LETÍCIA GUINDALINI MELLONI – nascida em três de janeiro de 1986 em Sertãozinho (SP), Brasil, ingressou em 2005, no curso de Agronomia na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”- Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Campus de Jaboticabal. Durante a graduação estagiou no Laboratório de Pós Colheita de 2005 a 2006 sob orientação do Prof. Dr. Ben-Hur Mattiuz e no período de 2006 a 2009 estagiou no Laboratório de Fisiologia Vegetal sob a orientação da Prof.^a Dr.^a Durvalina Maria Mathias dos Santos. Executou o estágio curricular obrigatório no Centro de Cana do Instituto Agrônomo de Campinas sob a supervisão do pesquisador Dr. Maximiliano Salles Scarpari no ano de 2009. Neste mesmo ano recebeu o grau de Eng.^o Agrônomo pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”- Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Campus de Jaboticabal. Em março de 2010 ingressou nesta mesma Universidade no curso de Mestrado em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas), sendo bolsista CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) durante o curso.

"Tente olhar pro amanhã agora e não para o ontem".
E as coisas que deixaste para trás
Todas as palavras de carinho que não foram ditas
O toque carinhoso que você não conseguiu encontrar

Nestes dias de faces sem nome
Não há uma verdade, somente partes.
Só possuo minha vida a oferecer.

Atreva-se a viver! Até o último momento.
Atreva-se a viver! Deixe o passado para trás.
Atreva-se a viver! Ofereça algo de si ao próximo.
"Até quando imaginar que não há nada mais a oferecer."

(G. Trovato/ C. Valli/ V. Anastazio)

“Dedico à minha Família e aos meus Amigos que são dádivas de Deus e sempre estão presentes em minha vida”.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus** por me presentear com uma vida maravilhosa me fornecendo sempre força e saúde e a **Nossa senhora** pela intercessão nos momentos de mais necessidade.

A toda minha **família**, principalmente aos meus pais, **Milton Carlos S. Melloni e Dulcinea Ap. Guindalini Melloni** pelo investimento na minha formação acadêmica, acreditando na minha capacidade, além de toda compreensão, carinho e atenção despendidos a mim que com certeza formaram a pessoa que sou hoje.

Aos meus irmãos, **Maria Natália G. Melloni e Felício J. G. Melloni** pelo amor e paciência fazendo com que meus dias se tornem mais agradáveis e felizes, aliviando os momentos de estresse e cansaço.

Aos meus tios e tias que me incentivaram e ajudaram nos momentos de nervosismo e angústia.

Aos meus primos e primas, em especial a **Marília**, por acreditarem em mim e me apoiarem desde a nossa infância.

A **Dr.^a Luciana Rossini Pinto** pela dedicação, pelos momentos de amizade, carinho, atenção e orientação, além dos memoráveis ensinamentos relacionados à vida profissional e pessoal.

Ao **Dr. Maximiliano Salles Scarpari** pela oportunidade, amizade e excelente co-orientação, bem como pelos conhecimentos passados a mim neste período que serão de grande valia na minha vida profissional.

Ao **Dr. Marcos Guimarães de Andrade Landell** pelas oportunidades oferecidas no Centro de Cana permitindo o meu crescimento profissional e pessoal.

Ao pesquisador **Jeremias de Mendonça**, pessoa especial que com sua amizade e amplo conhecimento me mostrou a importância do estudo e a beleza da vida.

Ao pesquisador **Dr. Júlio Garcia** pela amizade construída nestes anos e pela ajuda nos trabalhos desenvolvidos.

Aos funcionários da fazenda experimental do Centro de Cana do IAC, **Célia, Batoré, Umberto, Ozéias, Roberto, José Roberto e Tavera**, pela atenção que disponibilizaram ao longo de nossa convivência e por dividirem comigo as experiências de campo que tornaram mais tranqüilo o desenvolvimento dos trabalhos.

Aos funcionários que trabalham nas dependências internas do Centro, **Rômulo, Thiago, Victor, Sueli e Maria Augusta** por todo carinho, amizade e auxílio durante a permanência nesta instituição.

Aos funcionários da estação de Hibridação do IAC em Uruçuca-Ba ,em especial ao **Cassimiro**, pelo carinho fornecido a mim e ao auxílio profissional nos trabalhos lá desenvolvidos.

A todos os meus companheiros do laboratório de Biologia Molecular, em especial aos amigos **Flavia, Bruna, Cibele, Carol, Camila, Débora, Paula, Michael, Maicon, Rafael, Izadora, Priscila, João e Alexandre** que tornaram o período do mestrado maravilhoso e inesquecível, mostrando um novo sentido à palavra amizade.

A **Universidade Estadual Paulista** (UNESP) pelo embasamento teórico e científico fornecido a mim durante toda a minha formação acadêmica.

A **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior** (CAPES) pelo investimento e por acreditarem em meu trabalho.

Aos membros da banca **Dr. Rinaldo César de Paula e Dr. José Antonio Bressiani** pela exelente contribuição para a versão final desta dissertação.

Agradeço em especial à técnica do laboratório, a qual trago grande admiração, **Thais Monteiro Fávero** pela sua amizade se mostrando sempre solícita transmitindo a todos seus conhecimentos com paciência.

E a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

MUITO OBRIGADA!

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	iv
SUMMARY	vi
CAPÍTULO 1- CONSIDERAÇÕES GERAIS	1
INTRODUÇÃO.....	1
REVISÃO DE LITERATURA.....	3
Cana-de-açúcar	3
Florescimento da cana-de-açúcar.....	4
Viabilidade do pólen.....	6
Indução artificial do florescimento de cana-de-açúcar	8
Policruzamentos.....	9
Microsatélites e teste de exclusão de paternidade	10
OBJETIVOS GERAIS	12
Objetivos específicos	12
CAPÍTULO 2- ESTIMATIVA DA TAXA DE AUTOFECUNDAÇÃO POR MEIO DE MARCADORES MICROSATÉLITES EM UM POLICRUZAMENTO DE CANA-DE- AÇÚCAR	13
RESUMO-	13
INTRODUÇÃO.....	14
MATERIAL E MÉTODOS	16
Material	16
Policruzamento	16
Teste de germinação, semeadura das sementes e individualização das progênes.	17
Taxa de sobrevivência e porcentagem de seleção	17
Estimativa da taxa de autofecundação por marcadores moleculares	18
RESULTADOS	20
Teste de germinação	20

Taxa de sobrevivência e porcentagem de seleção	20
Estimativa da taxa de autofecundação.	21
DISCUSSÃO.....	24
CONCLUSÕES.....	28
.CAPÍTULO 3- COMPARAÇÃO ENTRE DOIS MÉTODOS DE COLORAÇÃO PARA VIABILIDADE DE PÓLEN EM INFLORESCÊNCIAS DA CANA-DE-AÇÚCAR.....	28
RESUMO	29
INTRODUÇÃO.....	30
MATERIAL E MÉTODOS	32
Material	32
Avaliação da viabilidade do pólen	32
Teste de germinação do grão de pólen em meio de cultura	33
Análise estatística dos dados.....	34
RESULTADOS	34
Avaliação da viabilidade do pólen com diferentes métodos de coloração e horários.....	34
Germinação do grão de pólen em meio de cultura x métodos de coloração	36
DISCUSSÃO.....	37
CONCLUSÕES.....	39
CAPÍTULO 4- FLORESCIMENTO DE GENÓTIPOS DE CANA-DE-AÇÚCAR SUBMETIDOS A DIFERENTES TRATAMENTOS FOTOPERIÓDICOS EM CÂMARA DE FOTOPERÍODO NO BRASIL.....	41
RESUMO	41
INTRODUÇÃO.....	42
MATERIAL E MÉTODOS	44
Material	44
Instalação do experimento	44
Indução do florescimento	45
RESULTADOS	47
DISCUSSÃO.....	51
CONCLUSÕES.....	54

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS55

FISIOLOGIA DO FLORESCIMENTO E VIABILIDADE DO GRÃO-DE-PÓLEN DA CANA-DE-AÇÚCAR (*Saccharum sp.*).

RESUMO - Este trabalho teve por finalidade o estudo da fisiologia e a viabilidade do pólen para fins de melhoramento de cana-de-açúcar. Para isto três trabalhos foram realizados. No primeiro foi estimada a taxa de autofecundação de famílias obtidas por policruzamento envolvendo quatro genótipos (IACSP95-5000, IAC94-1099, RB867515, SP89-1115) além do impacto da taxa de autofecundação nas taxas de sobrevivência e seleção das progênies obtidas. O policruzamento foi realizado na cidade de Ribeirão Preto-SP. Após o teste de germinação das sementes obtidas, as que apresentaram viabilidade (sementes da IACSP95-5000 e SP89-1115) foram semeadas em campo onde permaneceram por 10 meses para avaliação da taxa de sobrevivência (4, 6 e 10 meses) e seleção (aos 10 meses). A taxa de autofecundação foi determinada por meio de marcadores microssatélites. Para as progênies da IACSP95-5000 e SP89-1115 as taxas de autofecundação foram de 98,5% e 0% respectivamente. A taxa da sobrevivência foi maior para as progênies da SP89-1115 nas duas últimas avaliações bem como a taxa de seleção no valor de 78,26% contra 28,18% das progênies da IACSP95-5000. O segundo trabalho teve como objetivo comparar dois corantes (iodo 0,1N e azul de lactofenol) utilizados para avaliar viabilidade do pólen de inflorescências de cana-de-açúcar com a germinação em meio de cultura. A leitura da viabilidade do pólen foi realizada em microscópio fotônico (250x) para cada corante, dentro de cada horário, para quatro genótipos de cana-de-açúcar na estação de hibridação do IAC em Uruçuca-Ba. O meio de cultura para germinação foi composto de água de chuva, sacarose (300g/L) e ágar-ágar (10g/L). O corante azul de lactofenol mostrou queda da viabilidade do pólen com o passar das horas de avaliação, o corante de iodo não mostrou diferença. Comparando com a germinação em meio de cultura às 6 horas, os dois corantes não diferenciaram entre si, porém superestimaram a viabilidade obtida na germinação. As 8 e 9 horas, o corante de iodo superestimou a germinação do pólen e o azul de lactofenol a subestimou. No terceiro trabalho foi avaliado o comportamento de

17 genótipos de cana-de-açúcar perante a indução fotoperiódica artificial em câmara de fotoperíodo para o florescimento na cidade de Ribeirão Preto-SP. Foram utilizados 3 tratamentos de decaimento diário (30 s, 45s, 1 min) partindo das 12 horas e 55 min de luz. A faixa de temperatura (21-32°C) foi a mesma para todos os tratamentos e a umidade foi controlada por irrigação. Os genótipos responderam de forma diferente aos tratamentos em relação ao tempo de emissão da folha bandeira e a inflorescência, porém pôde-se verificar respostas a todos os tratamentos utilizados. As inflorescências emitidas apresentaram em sua maioria alta viabilidade de pólen pelo método da coloração com iodo a 0,1N possibilitando em cruzamentos.

Palavras-chave: Inflorescência, marcador molecular, fotoperíodo, hibridação.

SUGARCANE FLOWERING PHYSIOLOGY AND POLLEN VIABILITY (*Saccharum* sp.)

SUMMARY- The present work aimed to investigate the flowering and the physiology of pollen viability for sugarcane breeding. For these purpose three studies were conduce. In the first one, the selfing rate of polycross derived families involving 4 parents (IACSP95-5000, IAC94-1099, RB867515, SP89-1115) was estimate as also as its impact on the survival and selection rate of the progenies. The polycross was done at Ribeirão Preto-SP. After the seed germination test, those that were viable (IACSP95-5000 and SP89-1115 seeds) were planted in the field where stayed for 10 months for the survival (4, 6 and 10 months) and selection rate (at 10 months) evaluation. The selfing rate was estimated through microsatellite markers. For the progenies derived from IACSP95-5000 and SP89-1115 the selfing rates were 98.5% and 0% respectively. The survival rate was higher for SP89-1115 derived progenies at the last two evaluations as well as the selection rate with 78.26% against 28.18% observed for IACSP95-5000 progenies. In the second study two dyes (iodine 0.1N and lactophenol blue) used to evaluate pollen viability from sugarcane tassels were compared with the pollen germination at culture media composed by rain water, sucrose (300g/l) and agar-agar. The read of pollen viability was done with a photonic microscope (250x) for each dye, in each time for 4 sugarcane genotypes at the IAC cross station (Uruçuca-BA). The lactophenol dye showed a degree of pollen viability with the evaluation time while the iodine dye did not. Compared with the germination in culture media at 6 hours, both dyes did not differ, but, over estimated the viability obtained through germination. At 8 and 9 hours, the iodine dye over estimate the pollen germination while the lactophenol blue under estimate. In the third study the behavior of 17 sugarcane genotypes was evaluated in relation to artificial photoperiodic induction in a photoperiod facility for flowering at Ribeirão Preto-SP. Three daily decay trials (30 s, 45 s, 1 min) initiated from 12 hours and 55 minutes of light were evaluated. The temperature range (21-31°C) was the same for all the trials and the humid was controlled by irrigation. The genotypes behavior in a different manner to the trials in relation to the time for the flag leaf and

tassel emission, however, it was observed responses to all the trials evaluated. The emit tassels showed, in their majority, high pollen viability by the iodine dye method at 0.1N allowing further crosses.

Keywords: tassel, molecular markers, photoperiod, hybridization.

CAPÍTULO 1- CONSIDERAÇÕES GERAIS

INTRODUÇÃO

O florescimento da cana-de-açúcar para fins comerciais é indesejável aos produtores devido à perda de produtividade, porém para o melhoramento genético o florescimento é essencial para a obtenção de cruzamentos (MACHADO JR, 1987). No Brasil, o florescimento é sazonal, sendo esse na região nordeste favorecido pelas condições ambientais naturais onde se localizam as estações de hibridação dos programas de melhoramento de cana-de-açúcar.

O florescimento, no geral é muito influenciado por fatores ambientais como o fotoperíodo, a temperatura e umidade do ar e do solo (SRIVASTAVA et al., 2006), sendo que alguns desses podem comprometer a viabilidade do pólen impedindo a formação de semente.

O fotoperíodo é de extrema relevância no florescimento da maioria dos vegetais. Em relação a este fator, a cana-de-açúcar assume característica de planta de dias curtos, porém, para a indução do florescimento, dias curtos não são suficientes, sendo necessárias sucessivas noites longas para ocorrência do mesmo (TAIZ & ZAIGER, 2009). Para o pendoamento dessa espécie, o comprimento do dia ideal parece ser de 12 horas a 12 horas e 55 min para a maioria dos genótipos cultivados no mundo (BERDING, 1981). As regiões equatoriais apresentam as melhores condições para o florescimento, devido ao fato das mesmas possuírem fotoperíodo de 12 horas e menor oscilação de temperatura, à medida que ocorre o aumento da latitude o pendoamento da cana-de-açúcar é menor (BERDING, 1981).

O estado de São Paulo destaca-se entre as grandes regiões produtoras de cana-de-açúcar, apresenta grande variabilidade no índice de florescimento, no entanto esta variação não pode ser explicada somente pelo fotoperíodo, sendo também neste caso a temperatura uma forte influência neste processo (PEREIRA, 1985). Sabe-se que intermitentes temperaturas noturnas menores que 18°C durante a indução floral pode

reduzir a intensidade do florescimento e o atraso da emergência da panícula (GOSNELL, 1973). Ainda, a frequente ocorrência de temperaturas diurnas superiores a 32°C também podem diminuir a intensidade do florescimento ou atraso do mesmo (NUSS & BRETT 1977 citados por NAYAMUTH et al., 2003).

Da mesma forma que o desenvolvimento da panícula é sensível à temperatura, o grão de pólen tem sua viabilidade afetada por ela, sendo que as temperaturas baixas podem tornar o grão de pólen inviável (BERDING, 1981). Temperaturas noturnas abaixo de 15°C, antes ou durante o florescimento podem causar aborto das anteras, tornando assim as cultivares macho estéreis (MACHADO JR, 1987).

A umidade também é de grande importância na ocorrência do florescimento na cana-de-açúcar. A umidade do solo pode afetar adversamente o pendoamento, pois o déficit hídrico durante o ciclo indutivo atrasa e reduz o florescimento, uma vez que a água é necessária para ocorrer a translocação de fotoassimilados para o ápice e para o alongamento do pedúnculo da inflorescência (NAYAMUTH et al., 2003).

Apesar do conhecimento dos fatores que podem influenciar no florescimento da cana-de-açúcar são poucos os trabalhos que estudam melhores condições de cruzamentos e manutenção da viabilidade do pólen em diferentes variações locais do Brasil, bem como estudos que induzam artificialmente o florescimento com finalidade de obtenção de introgressão gênica e planejamento de cruzamentos especiais.

Nesse sentido, este trabalho teve como objetivo estudar a fisiologia do florescimento e a viabilidade do grão de pólen da cana-de-açúcar para fins de melhoramento de cana-de-açúcar. Sendo assim, foram estabelecidas as condições de florescimento de forma controlada em Câmara de Fotoperíodo de cultivares comerciais de cana-de-açúcar, bem como a avaliação da viabilidade do grão-de-pólen em condições naturais de Ribeirão Preto abordada por meio da estimativa da taxa de cruzamento com marcadores moleculares como a avaliação da viabilidade do grão-de-pólen por meio de diferentes corantes.

REVISÃO DE LITERATURA

Cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar é pertencente à família Poaceae e gênero *Saccharum*, o qual possui várias espécies. No entanto, na atualidade o que se encontra plantado em campos comerciais são na sua maioria, genótipos provenientes de hibridação (SCARPARI & BEAUCLAIR, 2008). Quando se realiza os cruzamentos na busca de híbridos, procura-se cultivares com rusticidade, resistência a doenças e eventuais pragas, além da qualidade da matéria prima na busca de maiores teores de açúcar, ou seja, maior produção por área (DANIELS & ROACH, 1987). Sem dúvida o Brasil é considerado um país experiente na produção de cana-de-açúcar e seus derivados e por isso tem chamando atenção de grandes potências mundiais, principalmente, pelo aumento na demanda de energia sustentável (CHEAVEGATTI-GIANOTTO et al., 2011).

A produção mundial de cana-de-açúcar totaliza quase 1,5 bilhões de toneladas e segundo a CONAB (2011) a lavoura de cana-de-açúcar continua em expansão no Brasil, sendo que os maiores índices de aumento de área são encontrados na Região Sul e Sudeste. Além disso, a cultura apresenta desenvolvimento excelente no país, que resulta da utilização de novas tecnologias aplicadas no cultivo e ao clima favorável. A produtividade média brasileira está estimada em 76.039 kg/ha, 1,8% menor que a da safra 2010/11, que foi de 77.446 kg/ha devido à estiagem prolongada (abril a novembro de 2010), principalmente na região Centro Oeste e Sudeste (CONAB, 2011).

A busca de novos cultivares que superem as expectativas de produtividade por suportar condições desfavoráveis é constante pelos melhoristas de cana-de-açúcar, devido o aumento significativo do interesse mundial na produção de energia sustentável (CHEAVEGATTI-GIANOTTO et al., 2011). Desta forma, a quantidade de estudos relacionados à cana-de-açúcar tem crescido constantemente, porém não é proporcional

a sua importância mundial em termos de fonte alimentar e de energia (CHEAVEGATTI-GIANOTTO et al., 2011; LANDELL & BRESSIANI, 2008).

Florescimento da cana-de-açúcar

A inflorescência da cana-de-açúcar, conhecida como bandeira ou flecha, é uma panícula aberta com flores hermafroditas cada uma com um óvulo. Os pistilos têm a terminação com estigmas roxos ou avermelhados, o que caracteriza o aspecto plumoso da panícula, e o androceu é constituído por três estames sustentando uma antera cada (SCARPARI & BEAUCLAIR, 2008).

O processo de formação da inflorescência é de difícil definição, pois depende do cultivar, do clima da região e das mudanças que ocorrem nos anos agrícolas. O estímulo para o florescimento pode ocorrer durante 18 a 25 dias (CLEMENTES & AWADA, 1965) e para o hemisfério sul, os meses em que ocorre a diferenciação do meristema para a formação da inflorescência são os de fevereiro, março e abril, sendo que o florescimento ocorre nos meses de abril, maio e junho (HUMBERT, 1974; SCARPARI & BEAUCLAIR, 2008).

O florescimento pode ser dividido em quatro fases: a transformação do meristema apical em gema floral; transformação da gema floral em inflorescência; desenvolvimento da inflorescência e da folha bandeira e finalmente a emissão da inflorescência. A primeira fase é bem curta, e logo se inicia a segunda em que ocorre o desenvolvimento no eixo principal das ramificações e ramos secundários. Também nesta fase surge o tecido meristemático que dá origem a bainha da folha bandeira, que tem por função, proteger a inflorescência. Na terceira fase, ocorre o alongamento da bainha da folha bandeira e o desenvolvimento da inflorescência, cujo eixo principal chega a mais de 60 cm. Nesta fase ainda ocorre o completo desenvolvimento das espiguetas e na quarta ocorre a emissão da inflorescência que é seguida pela abertura das flores e da polinização. Para a completa emissão são necessárias de 4 a 5

semanas, enquanto a abertura das flores, formação de frutos e maturação, não mais que 2 a 3 semanas.

O florescimento em cana-de-açúcar é sazonal, e muitos são os fatores que regem sua ocorrência, dentro destes estão os ambientais, como fotoperíodo, temperatura e a umidade (LABORD, 2007). Dentre eles, o fotoperíodo destaca-se por ser um dos principais fatores determinantes do metabolismo nos vegetais (ALEXANDER, 1973; TAIZ & ZAIGER, 2009).

Em relação ao fotoperíodo, para que as plantas percebam as menores mudanças de luz, estas possuem diferentes pigmentos. Estes pigmentos não somente percebem a presença da luminosidade, mas também a diferença na sua intensidade como ocorre no amanhecer e no entardecer (TAIZ & ZAIGER, 2009). Ainda, além dos sinais relativos ao amanhecer e ao entardecer e das fases do seu relógio circadiano endógeno, esses pigmentos são sensíveis a pequenas mudanças no comprimento do dia (IMAZUMI et al. 2004, TAIZ & ZAIGER, 2009).

Em relação ao fotoperíodo indutivo da floração há divergências entre pesquisadores quanto à classificação da cana-de-açúcar como sendo planta de dia longo ou planta de dia curto. Para alguns autores como MOORE (1987) as mudanças do meristema apical para transformar-se em inflorescência, ocorrem durante o período de dias curtos, porém para outros como CLEMENTS (1968) e CLEMENTS & AWADA (1967) há uma tendência em se classificar a cana-de-açúcar como sendo intermediária em relação ao fotoperíodo.

Pode-se dizer que as melhores condições para o florescimento acontecem nas regiões equatoriais do globo terrestre, onde tem-se fotoperíodos de 12 horas de luz e 12 horas de escuro, com pequenas variações de temperatura. Segundo BERDING (1981), o fotoperíodo ideal para o florescimento de cana-de-açúcar parece ser de 12 horas a 12 horas e 55 min, e a maioria dos cultivares são induzidas neste intervalo nas diferentes regiões do mundo.

Sabe-se que no estado de São Paulo, ocorre grande variabilidade do índice do florescimento, e isto evidencia que o fotoperíodo não é o único fator controlador do florescimento, tendo grande influência a temperatura (PEREIRA, 1985). Ainda, acredita-

se que nos locais de ocorrência abundante de florescimento a temperatura mínima raramente fica abaixo de 18°C e as máximas nunca ultrapassam os 32-35°C (ARALDI et al., 2010, BERDING, 1981) e que temperaturas abaixo de 21°C podem atrasar o crescimento e a emergência da panícula (CLEMENTS & AWADA, 1967). A temperatura também pode afetar a morfologia das panículas, como o tamanho. No geral, segundo ARALDI et al. (2010), temperaturas amenas em Poaceae, aumentam o tamanho das inflorescências.

Muitos pesquisadores observaram que em locais onde temperaturas e fotoperíodos indutivos ocorriam naturalmente e raramente acontecia à inibição da floração da cana-de-açúcar, quando este fenômeno não ocorria, notou-se que ocorreram mudanças nas precipitações anuais (MOORE, 1987).

A adequada umidade é crítica não somente para a indução da panícula, mas também no tempo que se leva para que a mesma se desenvolva completamente, pois garante a antese e, conseqüentemente, a produção das sementes (MOORE & NUSS, 1987) e isso se deve principalmente pelo fato da água ser o agente transportador dos fotoassimilados para a panícula. A abertura da flor e a exposição das anteras também são afetadas pela umidade relativa do ar e esses fenômenos ocorrem durante várias horas antes do amanhecer, quando a planta está totalmente hidratada e a umidade relativa é elevada (MOORE & NUSS, 1987) tornando a viabilidade do pólen máxima.

Viabilidade do pólen

O grão de pólen da cana-de-açúcar é consideravelmente pequeno com uma meia-vida de apenas 12 min após a dispersão pelo vento com perda da viabilidade após 35 min (SCARPARI & BEAUCLAIR, 2008) o que dificulta e muito sua armazenagem. Sua formação inicia-se com o desenvolvimento dos estratos parietais da antera, que indica o início da divisão meiótica sendo que neste período de desenvolvimento são estimuladas as transformações celulares, em que o arquespório torna-se tecido esporogênico que se modifica em células-mãe dos andrósporos, formando o micrósporo

e, consecutivamente, o grão de pólen, cuja sensibilidade é alta em relação à sua viabilidade, principalmente quando exposto às condições ambientais adversas (APPEZZATO-DA-GLORIA & CARMELO-GUERREIRO, 2006). Com isto, os estudos da viabilidade de pólen em vegetais são de suma importância para os programas de melhoramento genético, podendo também ser de grande utilidade para diagnosticar fatores envolvidos na formação de flores e embriões (OLIVEIRA, 2007).

A viabilidade do pólen e o grau de deiscência das anteras da cana-de-açúcar variam de genótipo pra genótipo, mas está relacionada principalmente com a temperatura e umidade (OLIVEIRA, 2007). Neste contexto, pode-se dizer que um dos maiores problemas encontrados pelos melhoristas em latitudes mais altas é a pouca e inconstante floração assim como a inviabilidade do pólen nestes locais (BERDING, 1981). Isto porque nem sempre ocorre naturalmente fotoperíodo indutivo, e ainda, muitas vezes quando ocorre o florescimento, as temperaturas noturnas são baixas, o que torna o pólen inviável, impedindo eventuais cruzamentos. Sabe-se que as temperaturas mais altas tanto antecipam o florescimento, quanto mantém a viabilidade do pólen, bem como a quantidade de sementes viáveis na panícula (MOORE, 1987).

A umidade também tem grande participação na viabilidade do pólen para todas as plantas, em específico para cana-de-açúcar. Quando observada a capacidade de germinação do pólen de uma inflorescência, é verificado que esta é bem reduzida nos primeiros 20 min e ainda totalmente reduzida depois de 30 min, mas sua viabilidade pode ser aumentada em até três horas, dependendo da umidade do ar (MOORE, 1976 citado por MOORE, 1987). A viabilidade do pólen é mantida com a umidade do ar acima de 67% e a máxima germinação ocorre em umidades acima de 85%.

Sabe-se que há diferença quanto à sensibilidade do pólen entre cultivares de cana-de-açúcar em relação às condições ambientais adversas. Isto é muito observado nos programas de melhoramento, quando cultivares em mesmas condições ambientais apresentam diferença na viabilidade do pólen, ou ainda grande quantidade de polens viáveis mesmo em condições ambientais que o tornaria inviável (baixa umidade relativa do ar e temperaturas abaixo de 18 °C ou acima de 32 °C).

É necessário ressaltar a importância de pesquisas com a viabilidade de pólen da cana-de-açúcar, haja vista a baixa quantidade de estudos que abordam este tema de forma específica a ponto de fornecer informações para melhores condições de cruzamento e obtenção de sementes híbridas em quantidades adequadas.

Indução artificial do florescimento de cana-de-açúcar

Para um programa de melhoramento de cana-de-açúcar, a abundância e qualidade das flores é essencial, porém isto de nada adianta se não se conseguir bom sincronismo do florescimento para a obtenção de bons cruzamentos (SRIVASTAVA et al., 2006).

A indução e sincronismo da floração de diferentes clones para a obtenção de um cruzamento requer algumas requisitos tais como, o tempo de florescimento e condições ambientais adequadas para o florescimento de cada cultivar, instalações adequadas para o avanço ou atraso da floração como também, o conhecimento dos efeitos do atraso e antecipação do florescimento nas diferentes variedades. O conhecimento destas informações se torna extremamente necessário para que se possa induzir o florescimento de diferentes cultivares de forma sincronizada. Para isto deve-se conhecer o comportamento das cultivares que serão induzidas em um vasto número de tratamentos fotoperiódicos. No Brasil, ainda não se conhece o fotoperíodo indutivo das cultivares utilizadas nos programas de melhoramento, pois não há trabalhos desenvolvidos na área de sincronismo de florescimento em Câmara de Fotoperíodo, em condições artificiais.

Fotoperíodos artificiais podem fazer com que clones que atrasem o florescimento naturalmente possam adiantar o florescimento (NUSS, 1978). Por hora, estudos envolvendo o fotoperíodo indicam que o florescimento precoce é obtido quando plantas de florescimento tardio são transferidas para uma câmara escura antes do por do sol durante 15 min (MACCOLL, 1977). Assim, se propõe que em latitudes equatoriais, aonde o comprimento do dia natural, não chega a 12 h e 30 min, a iniciação precoce do

florescimento pode ser alcançada pela iluminação das plantas por 20 min antes do amanhecer e, posteriormente, redução gradual do tempo entre a madrugada artificial e natural antecipando a floração em algumas semanas (MOORE, 1957 citado por MOORE & NUSS, 1987). Ainda, para induzir o florescimento na cana-de-açúcar pode-se fazer, em condições artificiais, uma pequena diminuição de 30 a 60 segundos por dia do fotoperíodo de aproximadamente 12h e 30 min (MOORE & NUSS, 1987; BERDING, 1995), ajustando para mais ou para menos o comprimento do dia para o local que se deseja induzir o florescimento.

Com o uso do sincronismo do florescimento é possível atrasar ou retardar o florescimento das cultivares, apesar disso, os melhoristas que utilizam do sincronismo para obter os cruzamentos de cana-de-açúcar têm percebido que se tem mais sucesso quando se atrasa o florescimento das cultivares de floração precoce do que quando se tenta adiantar o florescimento de cultivares que florescem mais tardiamente (MOORE, 1987).

A utilização de luzes artificiais (lâmpadas) que aumentem o comprimento do dia pode atrasar o florescimento de cultivares precoces em florescimento, o que não ocorreria se estas fossem expostas a um fotoperíodo indutivo (BRETT & HARDING, 1974). Outro método muito utilizado por melhoristas para atrasar o florescimento de cultivares de floração precoce é interromper o período de escuro com luz. MIDMOORE (1980) interrompeu o período de escuro com 2 h de luz no meio da noite, impedindo o florescimento que ocorreria em condições fotoperiódicas naturais. Este mesmo pesquisador percebeu que em fotoperíodo indutivo natural, o desenvolvimento da panícula é bem mais rápido, porém, a viabilidade do pólen é baixa e em condições de atraso do fotoperíodo indutivo se observa um lento desenvolvimento da panícula, com alta viabilidade do pólen (ROACH, 1978 citado por MOORE, 1987).

Policruzamentos

Cada programa de melhoramento genético utiliza uma ou mais formas de cruzamentos, sendo uns mais ou menos eficientes que os outros. Segundo alguns

autores, existem mais ou menos 25 programas de melhoramento de cana-de-açúcar espalhados pelo mundo e cada melhorista tem desenvolvido seus próprios processos de hibridação e seleção por experiências adquiridas durante os processos de melhoramento (LANDELL & BRESSIANI, 2008).

O policruzamento é um método bastante utilizado para plantas alógamas que podem ser propagadas vegetativamente, como exemplo, a cana-de-açúcar. No policruzamento, o objetivo é arranjar os cultivares envolvidos no cruzamento, de forma que todos tenham a possibilidade de polinizar e serem polinizados ao acaso pelos demais (BRAVO et al., 1981; BORÉM & CAVASSIM, 1999). Para estes cruzamentos, os cultivares envolvidos são colocados em um local isolado para que não ocorra contaminação com pólen de plantas que não estão no campo de policruzamento (BORÉM & CAVASSIM, 1999; LANDELL & BRESSIANI, 2008). Em cana-de-açúcar este tipo de cruzamento foi desenvolvido no Havaí com o objetivo de avaliar um grande número de genitores de modo mais rápido com baixo custo (WARNER, 1954 citado por CABRAL, 2007).

Com o possível intercruzamento de todos os genótipos, aumentam-se as chances de se obter novas combinações gênicas e, conseqüentemente, aumentam-se as possibilidades de seleção de genótipos favoráveis.

Em cana-de-açúcar, o policruzamento é utilizado por produzir um grande número de sementes, e quando não se conhece a capacidade de combinação dos genótipos utilizados como macho, além de ser um método mais barato, pois exige menores gastos com a manutenção do cruzamento (menos solução, menos lanternas etc.). Com isto, o policruzamento vem despertando a curiosidade dos melhoristas de cana-de-açúcar a fim de verificar sua viabilidade de emprego nos programas de melhoramento.

Microssatélites e teste de exclusão de paternidade.

De acordo com FERREIRA & GRATTAPAGLIA (1998), marcador molecular pode ser definido como todo e qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso ou

de um segmento de DNA que pode ou não corresponder a regiões expressas do genoma (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

Dentre os marcadores moleculares se destacam os microssatélites (SSR). Os microssatélites são compostos por sequências de 1 a 6 pares de bases, conhecidas como motivos, que são repetidas lado a lado (em *tandem*) (SAI et al., 1997; ZANE et al., 2002). Os motivos podem ser compostos por uma única base (repetição de mononucleotídeo), duas bases (repetições de dinucleotídeos), três bases (trinucleotídeos), quatro bases (tetranucleotídeos) e até seis bases (hexanucleotídeos).

Embora, o número de vezes que o motivo se repete, geralmente seja variável, a sequência de bases adjacentes ao microssatélite pode ser singular e única no genoma sendo conservada entre diferentes indivíduos da mesma espécie, possibilitando assim o desenho de *primers* específicos para as sequências adjacentes a um dado microssatélite (AMORIM, 2005) e sua amplificação através da reação em cadeia da polimerase, PCR (*Polymerase Chain Reaction*).

O polimorfismo observado nos produtos oriundos da amplificação dos locos de microssatélites entre diferentes indivíduos reflete a variação no número de vezes que o motivo se repete podendo ser separados em géis de agarose ou poliacrilamida.

A distribuição dos microssatélites nos genomas dos vegetais está em uma frequência de um a cada 50 mil pares de bases, sendo o elemento mais repetido o dinucleotídeo AT (MORGANTE & OLIVIERI, 1993).

Os microssatélites (SSR) possuem herança Mendeliana e comportamento codominante, permitindo assim a identificação de indivíduos homozigóticos e heterozigóticos na população. Marcadores do tipo microssatélites tem sido utilizados com sucesso para teste de paternidade ou exclusão de paternidade em animais e vegetais (MEAGHER & THOMPSON, 1986; MEAGHER, 1986; MCINTYRE E JACKSON, 2001; MANIGBAS & VILLEGAS, 2004; PAN et al., 2006; TEW E PAN 2010).

OBJETIVOS GERAIS

Estudo da fisiologia do florescimento e a viabilidade do pólen para fins de melhoramento de cana-de-açúcar

Objetivos específicos

- Estimar a taxa de autofecundação de famílias obtidas de um policruzamento por meio de marcadores moleculares.
- Comparar a leitura da viabilidade do pólen de genótipos de cana-de-açúcar por meio de dois corantes com a germinação do pólen em meio de cultura
- Analisar o comportamento genótipos de cana-de-açúcar quando expostos a diferentes tratamentos fotoperiódicos indutivos ao florescimento.

CAPÍTULO 2- ESTIMATIVA DA TAXA DE AUTOFECUNDAÇÃO POR MEIO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES EM UM POLICRUZAMENTO DE CANA-DE-AÇÚCAR

RESUMO- A taxa de autofecundação estimada por marcadores microssatélites bem como o seu impacto nas taxas de sobrevivência e seleção foram avaliadas em famílias obtidas a partir de policruzamento composto por genitores (IACSP95-5000, IACSP91-1099, SP89-1115, RB867515) muito utilizados no melhoramento de cana-de-açúcar no Brasil. O florescimento e o policruzamento foram realizados, em Ribeirão Preto, SP em condições naturais. Após o teste de germinação, as progênies que apresentaram sementes viáveis (IACSP95-5000 e SP89-1115) foram levadas a campo para avaliação da taxa de sobrevivência (4, 6 e 10 meses) e seleção para as características fenotípicas de desenvolvimento e sanidade. A taxa de autofecundação obtida para a IACSP95-5000 foi de 98,5% e de 0% para SP89-1115 com base em 44 e 28 marcadores microssatélites, respectivamente. As taxas de sobrevivência nas duas últimas avaliações e seleção foram significativamente maiores nas progênies da SP89-1115 (cruzamento) em relação às da IACSP95-5000 (autofecundação). A influência ambiental (temperatura e umidade) teve papel importante durante a realização do policruzamento. A cultivar IACSP95-5000 se sobressaiu tanto como doadora de pólen com capacidade de fecundação, como na produção de sementes viáveis nas condições ambientais de Ribeirão Preto.

Palavras chave: *Saccharum spp.*, florescimento, grão-de-pólen, melhoramento.

INTRODUÇÃO

O melhoramento genético da cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) se inicia pelo processo de hibridação conduzido por meio de cruzamento bi-parental, em que são utilizados dois genitores, ou de policruzamento envolvendo um grupo de genitores.

O policruzamento é um método bastante utilizado para plantas alógamas que podem ser propagadas vegetativamente, como exemplo, a cana-de-açúcar. No policruzamento, o objetivo é arranjar os cultivares envolvidos no cruzamento, de forma que todos tenham a possibilidade de polinizar e serem polinizados ao acaso pelos demais (BRAVO et. al., 1981; BORÉM & CAVASSIM, 1999). Em cana-de-açúcar, este tipo de cruzamento foi desenvolvido no Havaí com o objetivo de avaliar um grande número de genitores de modo mais rápido e com baixo custo (OLAOYE, 2001).

Para a realização de um policruzamento é preciso conhecer, para cada cultivar utilizado na hibridação, a capacidade das inflorescências de receber e doar pólen, caracterizando-as como receptoras (fêmeas) ou doadoras (macho) de pólen. Os programas de melhoramento costumam utilizar os métodos de coloração de pólen com corantes específicos, por fornecerem estas informações de forma rápida, já que o fluxo de cruzamentos durante o processo de hibridação, em geral, é muito intenso.

O método mais utilizado nos programas de melhoramento no Brasil é o da coloração por iodo, que consiste na maceração de anteras maduras em lâminas no microscópio com solução de iodo a 0,1 N. Este método se baseia na coloração do amido, que na presença da solução de iodo fica azulado, e assim acredita-se que estes polens tenham condições de polinizarem e formarem sementes. Quanto maior a quantidade de polens azulados em relação aos que permanecem amarelados, maior a possibilidade da inflorescência ser doadora em condições de cruzamento (MACHADO JR., 1987).

Entretanto, a viabilidade do pólen da cana-de-açúcar apresenta-se muito sensível, já na formação da inflorescência, sendo os principais fatores de interferência a umidade relativa do ar, que deve estar acima de 85% e a amplitude de temperatura, que não pode ultrapassar os 32°C nem ficar abaixo de 18°C (MOORE, 1987; BERDING

& MOORE, 2001). Além disso, a viabilidade do pólen e o grau de deiscência das anteras da cana-de-açúcar podem variar entre diferentes genótipos (MCINTYRE E JACKSON 2001), o que sugere que a amplitude de temperatura e umidade exigida, pode variar de um cultivar para outro.

Marcadores do tipo microssatélites tem sido utilizados com sucesso para teste de paternidade ou exclusão de paternidade em animais e vegetais (RIDAY & KROHN, 2010; MORONI et al., 2008; SAHLI & CONNER, 2011) bem como na estimativa da taxa de cruzamento (KITTELSON & MARON, 2000; MULUVI et al., 2004; SOENGAS et al., 2011). A taxa de cruzamento, estimada por meio de marcadores moleculares, pode ser utilizada para a verificação da disponibilidade do pólen, pois identifica nas progênes a eficiência do policruzamento, ou seja, se ocorreu participação efetiva de todos os genitores tomados como doadores de pólen.

Em cana-de-açúcar, são poucos os trabalhos utilizando marcadores moleculares para estimar a taxa de cruzamento ou autofecundação em famílias derivadas de cruzamentos bi-parentais ou de policruzamentos (MCINTYRE & JACKSON, 2001; PAN et al., 2006; TEW & PAN, 2010). Marcadores do tipo RAPD (*Random Amplification Polymorphism DNA*) foram utilizados para estimar a taxa de autofecundação, em oito famílias derivadas de cruzamentos bi-parentais do Programa de Melhoramento da Austrália, as quais variaram de 0 a 17,6% (MCINTYRE & JACKSON, 2001). TEW & PAN (2010) utilizaram marcadores moleculares do tipo microssatélites para identificar os genitores masculinos das progênes originadas de policruzamentos, complementando as informações de pedigree das progênes obtidas para futuros cruzamentos.

O conhecimento da taxa de autofecundação, quer seja de famílias oriundas de cruzamentos biparentais ou de policruzamentos, é de fundamental importância nos Programas de Melhoramento, para permitir uma correta avaliação do comportamento da família e conseqüentemente, da estimativa do valor de melhoramento dos genitores envolvidos no respectivo cruzamento (MCINTYRE & JACKSON, 2001).

Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi estimar a taxa de autofecundação de famílias obtidas de um policruzamento composto por genitores muito utilizados no

melhoramento de cana-de-açúcar no Brasil, assim como avaliar o seu impacto nas taxas de sobrevivência e seleção das progênes obtidas.

MATERIAL E MÉTODOS

Material

Neste trabalho foram utilizados os genótipos: IACSP95-5000, SP89-1115, RB867515 e IAC91-1099 retirados de canavial de primeiro corte com aproximadamente 10 meses de idade. O florescimento ocorreu em condições naturais, no ano de 2009, no Centro de Cana (IAC) em Ribeirão Preto-SP.

O ano de 2009 apresentou com 14 dias com temperaturas maiores que 18 °C e menores que 31 °C resultando em um ano de 58% probabilidade de florescimento (PEREIRA, 1985) .

Policruzamento

Os colmos com inflorescência foram etiquetados com os nomes das respectivas cultivares e coletados para retirada das folhas e flores abertas. A predição da viabilidade do pólen das inflorescências foi realizada pela coloração do grão de pólen com solução de iodo (0,1N), com posterior leitura em microscópio do percentual de grãos de pólen azulados (doadora) ou amarelados (receptora) segundo MACHADO JR. (1987). De acordo com o percentual de pólen azulado foram dadas as notas de 1 (100%) a 9 (0%), sendo aquele cultivar de nota 1 utilizado como macho e 9 como cultivar fêmea. As cultivares IACSP95-5000, IAC91-1099, SP89-1115 e RB867515 apresentaram respectivamente as seguintes notas de viabilidade, 1 (doadora), 3 (doadora), 8 (receptora) e 4 (doadora), tornando possível a realização do policruzamento.

Os colmos foram levados para local isolado e colocados em um mesmo balde de plástico com solução ácida (150ppm SO₂, 75ppm H₃PO₄, 37ppm H₂SO₄, 37ppm HNO₃) segundo Mangelsdorf (1966). Para manter a composição da solução foi acrescentado, diariamente, 10% do volume do balde de SO₂ com renovação da mesma, a cada 72 h (LIU, 1965; MANGELSDORF, 1966). No 14º dia, as inflorescências foram encapsuladas com sacos de tecido poroso (TNT) e após 21 dias as espiguetas foram retiradas da ráfis de cada cultivar e colocadas em sacos em tambor fechado com sílica durante sete dias para retirada da umidade e término da maturação das sementes. Após uma semana, as sementes foram colocadas em estufa na temperatura de 32 °C ± 1 para completa secagem e posterior beneficiamento. Durante os 21 dias do policruzamento as temperaturas máximas e mínimas, bem como a umidade do ar pela manhã e tarde foram monitoradas, sendo os dados anotados todos os dias. O registro da umidade mais baixa durante este período foi de 36% e a mais alta de 89%. Para a temperatura, a menor foi de 17°C e a máxima de 28°C.

Teste de germinação, semeadura das sementes e individualização das progênes

Para o teste de germinação, retirou-se uma amostra de 0,5g do peso total de sementes produzidas por cada cultivar e colocada em caixa do tipo Gerbox contendo meio a base de água, ágar-ágar e carvão ativado e mantidas em câmara de germinação tipo B.O.D com temperatura de 30 °C ± 1 °C, por um período de 7 dias. As sementes remanescentes (progênes) provenientes de cada parental que apresentaram viabilidade pelo teste de germinação foram semeadas em caixas plásticas (50 x 30 cm) contendo substrato Plantmax[®], permanecendo por 30 dias. Posteriormente, as plântulas foram individualizadas em tubetes para plantio a campo em espaçamento de 1 m entre linhas e 0,5 m entre plantas.

Taxa de sobrevivência e porcentagem de seleção

A avaliação da taxa de sobrevivência foi realizada em três épocas (4, 6 e 10 meses) após o plantio a campo considerando em cada época a porcentagem de plantas vivas em relação ao número total de progênies de cada família.

A porcentagem de seleção foi estimada nas famílias aos dez meses após o plantio, a partir de seleção massal de plantas saudáveis e com bom perfilhamento. A porcentagem de plantas selecionadas, em relação ao número total de progênies de cada família, resultou na porcentagem de seleção.

Estimativa da taxa de autofecundação por marcadores moleculares

Extração do DNA e amplificação dos SSRs

O DNA foi extraído a partir do tecido foliar de acordo com o protocolo de AL-JANABI et al. (1999). As reações de PCR foram efetuadas em um volume final de reação de 15 µl contendo 40 ng do DNA molde, 0,2 µM de cada par de *primer* (*forward* e *reverse*), 100 µM de cada dNTP, 2,0 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, e 0,5 unidade de Taq DNA polimerase. O programa de amplificação constituiu de uma desnaturação inicial à 94 °C por 5 min, seguida de 30 ciclos, cada ciclo contendo uma etapa de desnaturação à 94 °C por 30 s, temperatura de anelamento específica para cada par de *primer* (*forward/reverse*) por 30 s, extensão à 72 °C por 30 s, e um ciclo final à 72 °C por 3 min. Os produtos da amplificação foram misturados com tampão formamida (98% formamida; 10 mM EDTA; 0.025% azul de bromofenol; 0.025% xilene cianol) na proporção (2 tampão :1 amostra) e desnaturados à 95 °C por 5 min. As amostras foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante a 6% utilizando ladder de 10 bp como marcador de peso molecular. As bandas foram reveladas pela coloração com prata de acordo com o protocolo estabelecido por CRESTE et al. (2001).

Os pares de primers utilizados nas progênies da cultivar IACSP95-5000 foram SCB312, SCB436, SCB381 e SCC01 (PINTO et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2010), e para as progênies da cultivar SP89-1115 foram SMC31CUQ, SMC2017FL, SMC1047HA (PAN, 2006), SCA48 e SCC01 (PINTO et al., 2004). Os pares de primers foram escolhidos por apresentarem boa resolução e polimorfismo. Porém alguns pares de primers utilizados primeiramente nas progênies da cultivar SP89-1115, não apresentaram boa resolução de banda nas progênies da cultivar IACSP95-5000, o que poderia causar equívocos na genotipagem, desta forma, estes foram substituídos.

Análise dos dados moleculares

Os marcadores foram genotipados com base na sua presença (1) e ausência (0) para cada um dos pares de primers de microssatélites avaliados. Para a estimativa da taxa de autofecundação de cada família de policruzamento foi realizado o teste de exclusão de paternidade considerando apenas os marcadores presentes nas progênies e ausentes no respectivo genitor feminino e, portanto, herdados do genitor masculino. A similaridade genética dentro das famílias foi estimada de acordo com o coeficiente de Jaccard utilizando o Programa NTSYS-PC, versão 2.0 (Exeter Software, NY, E.U.A.; ROHLF 1993).

Análise estatística dos dados fenotípicos

A análise estatística utilizada para taxa seleção, sobrevivência e germinação foi a do intervalo de confiança a 95% de probabilidade.

RESULTADOS

Teste de germinação

O teste de germinação para as sementes obtidas no policruzamento indicou viabilidade apenas para as cultivares SP89-1115 e a IACSP95-5000. O resultado da germinação foi de 7 plântulas/0,5g de sementes para SP89-1115 e 18 plântulas/0,5g de sementes para a IACSP95-5000. O intervalo de confiança a 95% de probabilidade mostrou pequena sobreposição (Tabela 1).

Tabela 1. Peso em gramas (g) e teste de germinação (indivíduos/0,5g de sementes) das sementes obtidas no policruzamento.

Cultivares	Peso das Sementes (g)	T. G. (ind./0,5g)	I.C. (95%)	Nº de plântulas remanescentes
SP89-1115	2,58	7	[1,10 a 10,89]	24
IACSP95-5000	5,38	18	[9,93 a 21,00]	133
IAC91-1099	3,62	0	-	
RB86-7515	2,36	0	-	

T.G: teste de germinação; I.C. : Intervalo de Confiança;

As cultivares SP89-1115 e IACSP95-5000, após o plantio das sementes remanescentes (2,08 g e 4,88 g) deram origem a 24 e 133 indivíduos respectivamente, as quais foram utilizadas para a estimativa da taxa de autofecundação por marcadores moleculares.

Taxa de sobrevivência e porcentagem de seleção

As progênies proveniente da cultivar SP89-1115 apresentaram taxa de sobrevivência de 100% nas duas primeiras avaliações e de 95,83% na última avaliação, não diferindo significativamente no intervalo de confiança a 95% de probabilidade, entre

as duas últimas avaliações. Para as progênes provenientes da cultivar IACSP95-5000 a taxa de sobrevivência foi de 98,48% na primeira avaliação, 86,36% na segunda e 82,57% na última. Para esses indivíduos, a redução da sobrevivência foi significativa entre as avaliações (Figura 1).

Comparando os resultados para cada avaliação, entre as famílias oriundas das cultivares SP89-1115 e IACSP95-5000 verifica-se que a taxa de sobrevivência diferiu significativamente pelo intervalo de confiança a 95% de probabilidade na segunda e na terceira avaliação. A porcentagem de seleção obtida para a família da cultivar SP89-1115 foi maior (78,26%) do que a obtida para a IACSP95-5000 (28,18%) diferenciando significativamente pelo intervalo de confiança a 95% de probabilidade (Figura 1).

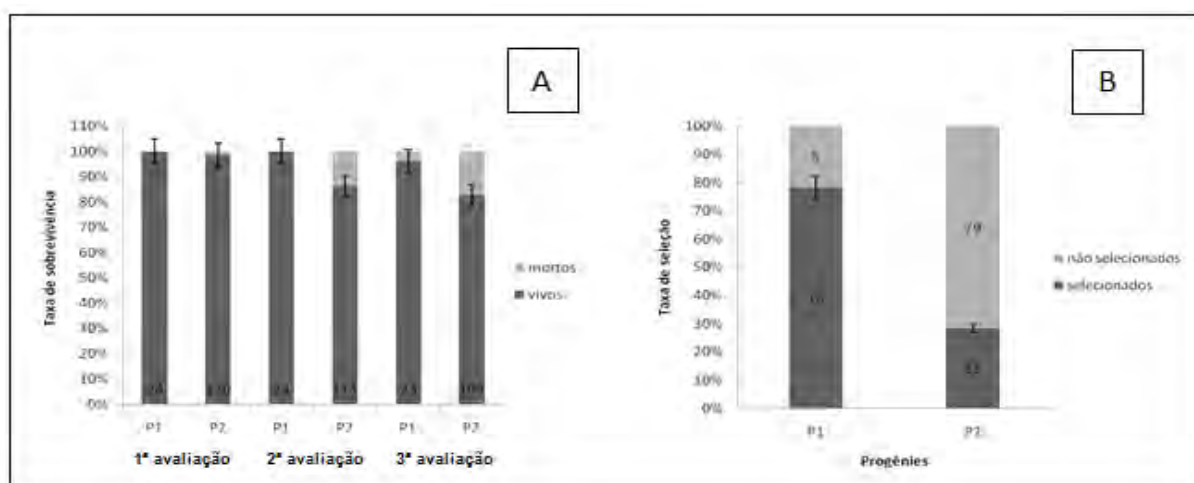


Figura 1. Avaliação das progênes de cana-de-açúcar do policruzamento em condições de campo. A. Taxa de sobrevivência obtida em três avaliações (4, 6 e 10 meses). B. Porcentagem de seleção aos 10 meses P1. Progênes da cultivar SP89-1115. P2. Progênes da cultivar IACSP95-5000.

Estimativa da taxa de autofecundação.

Para a estimativa da taxa de autofecundação da cultivar SP89-1115 foram necessários 6 pares de primers de microssatélites (SSRs) os quais geraram um total de

64 marcadores entre as progênies deste cultivar e as cultivares envolvidas no policruzamento. Considerando apenas os marcadores presentes nas progênies e ausentes no genitor feminino (SP89-1115), os quais, totalizaram 28 marcas, foi possível identificar 22 indivíduos oriundos de cruzamento (91,6%) com os genitores presentes no policruzamento e 2 contaminantes, ou seja, indivíduos cujos marcadores não estavam presentes em nenhum dos genitores masculinos considerados no policruzamento (Tabela 2).

Tabela 2. Marcadores ausentes na cultivar de cana-de-açúcar SP89-1115 e presentes nas progênies da SP89-1115 e genitores do policruzamento. P1: IACSP95-5000; P2: IAC91-1099 e P3: RB86-7515.

Marcas	P1	P2	P3	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
31cUQ1	1	1	1	1			1	1			1	1			1	1	1		1		1	1					1
31cUQ2	1				1	1	1	1	1	1			1		1		1	1	1	1	1	1			1	1	
31cUQ3	1			1	1		1	1	1	1	1		1	1	1	1	1	1		1	1	1	1	1	1	1	1
31cUQ5		<u>1</u>	<u>1</u>																								
2017f11		<u>1</u>	<u>1</u>																								
2017f12	1	1	1	1				1	1			1		1	1	1		1		1				1		1	
2017f13	1		1	1				1	1					1	1	1		1		1				1		1	
2017f14		<u>1</u>																									
2017f19	1	1		1	1	1	1			1	1	1	1	1	1	1		1	1	1	1	1			1	1	1
2017f111	1																										
SCA48.2		<u>1</u>	<u>1</u>																								
SCA48.4	1				1	1	1	1	1		1		1			1	1		1	1			1	1		1	
SCB312.4		<u>1</u>																									
SCB312.9	1			1	1		1		1		1		1		1	1				1							1
SCB312.11	1	1	1	1	1	1	1	1		1	1						1	1	1	1			1		1	1	1
SCB312.13	1					1	1	1	1	1		1		1		1			1		1	1	1	1		1	
SCB312.14			<u>1</u>																								
SCB436.6	1		1	1				1	1				1	1		1		1		1			1				
SCB436.8		<u>1</u>																									
SCB436.10	1		1	1		1							1		1		1		1	1					1		1
SCC01.2																										1	1
SCC01.3	1	1			1				1		1	1	1		1		1	1	1				1	1		1	
SCC01.4		<u>1</u>																									
SCC01.5			<u>1</u>																								
SCC01.6	1	1																									
SCC01.7	1				1					1	1	1		1		1	1	1	1		1	1	1	1	1	1	
SCC01.8																											1*
SCC01.9																											1*
Total	16	13	11	9	8	6	8	9	9	6	8	6	5	7	6	10	7	9	7	10	10	6	7	8	6	9	8

Sublinhados representam marcas presentes nos possíveis pais que não estão nas progênies. Asterisco representa indivíduos contaminantes.

Com base neste resultado, a taxa de autofecundação para a cultivar SP89-1115 foi de 0%, uma vez que todos os indivíduos apresentaram, na totalidade dos marcadores avaliados, pelo menos um marcador ausente no genitor feminino. De acordo com os dados apresentados na Tabela 2, verifica-se que, com exceção das progênies 23 e 24, as demais são filhas da IACSP95-5000.

Para as progênies provenientes da cultivar IACSP95-5000, os 4 pares de primers de microssatélites utilizados geraram um total de 44 marcadores entre sua respectiva progênie e demais genitores presentes no policruzamento. A partir da seleção de 24 marcadores presentes apenas entre os prováveis genitores masculinos envolvidos no policruzamento e ausentes na IACSP95-5000 foi possível excluir a possibilidade de cruzamento de 131 dos 133 indivíduos avaliadas. A taxa de autofecundação para a IACSP95-5000 foi de 98,5% e, conseqüentemente, a de cruzamento foi de 1,5%.

Para as progênies da cultivar SP89-1115, os valores da similaridade genética variaram de 41,5% a 73% sendo que a similaridade genética média entre as progênies foi de 53% e a similaridade genética média das progênies e a SP89-1115 foi de 55,7%. Para as progênies da cultivar IACSP95-5000 os valores de similaridade genética média variaram de 52,9% a 100% com uma similaridade média entre as progênies de 80,70% e uma similaridade média das progênies e a IACSP95-5000 de 80,9% (Tabela 3).

Tabela 3. Valores de similaridade genética para as progênies de cana-de-açúcar derivadas, respectivamente das cultivares SP89-1115 e IACSP95-5000.

Progênies	SG(min)	SG (max)	SGp	SGpg
SP89-1115	0,415	0,73	0,529	0,557
IACSP95-5000	0,529	1	0,807	0,809

SG(min): similaridade genética mínima; SG(max): similaridade genética máxima; SGp: similaridade genética média entre progênies; SGpg: similaridade genética média entre progênies e o genitor feminino.

De acordo com a distribuição da frequência das progênies em relação à similaridade genética (Figura 2), verifica-se que as progênies da SP89-1115 se concentraram na classe de 60% de similaridade genética, enquanto as da IACSP95-5000, na classe de 90% de similaridade genética, condizente com o tipo de família obtido, respectivamente, de cruzamento e de autofecundação.

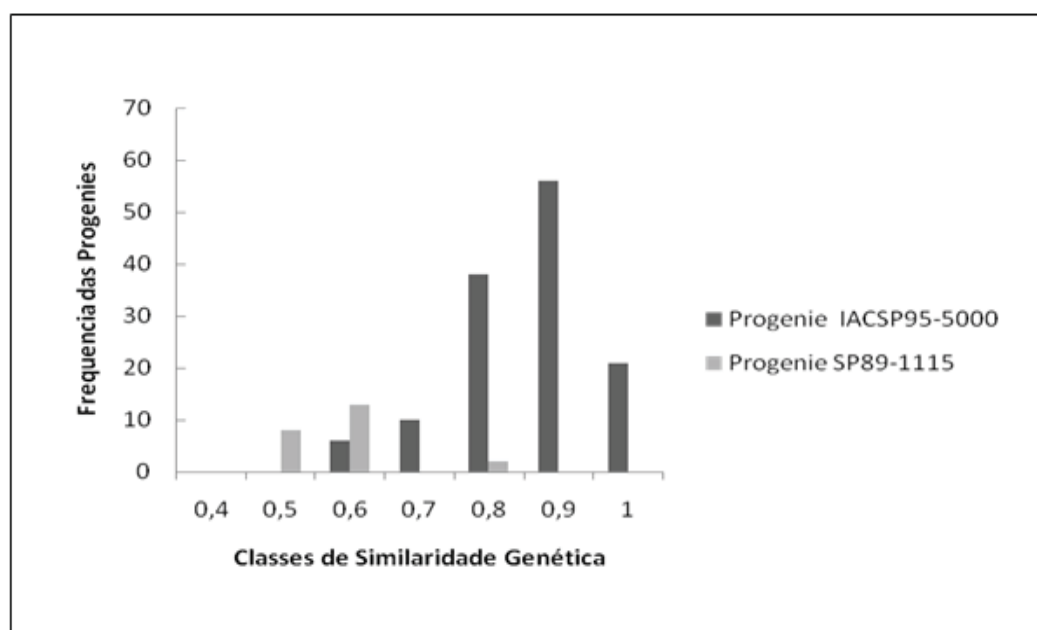


Figura 2. Distribuição de frequência das progênies da cultivar IACSP95-5000 e SP89-1115 em relação à similaridade genética.

DISCUSSÃO

A cana-de-açúcar é considerada uma espécie alógama e a presença de inflorescências hermafroditas permite a ocorrência de progênies de autofecundação, as quais, atualmente podem ser identificadas pelo uso de técnicas moleculares. De fato, no presente trabalho, o uso de marcadores moleculares do tipo microssatélites permitiu com sucesso, a identificação de indivíduos de autofecundação e de cruzamento

derivadas de um policruzamento envolvendo quatro genitores, e, conseqüentemente, a estimativa da taxa de autofecundação e do seu complemento, a taxa de cruzamento, em condições naturais de florescimento. Além disso, ficou evidente a importância das notas atribuídas aos genitores no processo de identificação das inflorescências para sua definição como doador e/ou receptor de pólen, como também a importância da utilização de genitores masculinos com notas para viabilidade de pólen não demasiadamente contrastantes no planejamento de um policruzamento.

Pelos resultados obtidos ocorreu participação efetiva dos grãos de pólen da cultivar IACSP95-5000, cuja quase totalidade (98,5%) de sua progênie foi de autofecundação, sendo esta cultivar também doadora de pólen para a maioria das progênies (91,6%) oriundas da SP89-1115. Este resultado foi corroborado tanto pela alta similaridade genética média entre as progênies da IACSP95-5000, como pela alta similaridade genética média das progênies com a própria IACSP95-5000, o que contrasta com o observado em relação a SP89-1115 na mesma comparação. Ainda, três progênies oriundas da cultivar IACSP95-5000, apresentaram-se iguais na avaliação da similaridade genética (100%) com a genitora IACSP95-5000, o que não descarta a possibilidade de apomixia. Tal possibilidade poderá ser investigada futuramente pela utilização de um maior número de marcadores moleculares, uma vez que, a apomixia está frequentemente associada às espécies poliploides (ASKER & JERLING, 1992; LO et al., 2009) como a cana-de-açúcar.

A forma de realização da identificação da participação das inflorescências como receptora ou doadora por meio da coloração do grão de pólen por iodo, mesmo sendo a mais utilizada por programas de melhoramento de cana-de-açúcar (MCINTYRE & JACKSON, 2001), não deve ser considerada a melhor maneira de se avaliar a viabilidade do pólen, principalmente, por se basear na sua reserva, o que não garante sua efetiva germinação, superestimando a viabilidade do mesmo (RODRIGUEZ-RIANO & DAFNI, 2000). Desta forma, as notas de viabilidade de pólen atribuídas para as inflorescências envolvidas no policruzamento pode ter sido equivocada, principalmente referindo-se às notas 3 e 4 atribuídas respectivamente para as cultivares IAC91-1099 (doadora) e RB86-7515 (doadora). É importante ressaltar que não somente a

viabilidade do pólen observada na coloração do pólen é relevante quando se pretende estabelecer um policruzamento, mas também a temperatura e a umidade devem ser adequadas, já que as cultivares podem ter respostas muito específicas quanto à viabilidade em diferentes condições, haja vista a baixa quantidade de sementes produzidas no policruzamento, o que provavelmente não aconteceria em condições ideais de temperatura e umidade.

A cultivar IACSP95-5000 se apresentou menos sensível a estas condições, uma vez que indicou viabilidade de pólen de 100% em Ribeirão Preto, onde no período de florescimento da cana a umidade é baixa e as temperaturas noturnas encontram-se abaixo de 18°C, condições essas que inviabilizam o grão de pólen da maioria das cultivares (BERDING, 1981; MOORE, 1987). Além disso, o monitoramento das condições climáticas durante a execução do policruzamento indicou temperaturas mínimas de 17°C para alguns dias, além de umidades abaixo de 85% em quase todo o período, e mesmo assim, este cultivar se sobressaiu perante aos outros na doação de pólen, indicando sua menor sensibilidade a condições adversas.

As inflorescências da cana-de-açúcar variam em cores, tamanhos e formas devido à diferença genética entre as cultivares ou ainda pelas condições de temperatura durante a indução e emissão da panícula (RYLE & LANGER, 1963; HEIDE 1982). Entretanto, a variação nas cultivares não aparece somente nestas características, mas também na quantidade de pólen produzida, observada quando se faz a contagem de polens em um foco na lâmina do microscópio a fim de obter a nota de viabilidade de pólen.

A cultivar IACSP95-5000, de nota 1 de viabilidade de pólen (100%) produziu visivelmente uma grande quantidade de pólen em comparação com as outras cultivares (dados não apresentados) que já possuíam menor quantidade de polens viáveis (notas maiores). As notas dadas às inflorescências, como informado anteriormente, se baseia na proporção de polens azulados para o total de polens presentes na lâmina de microscópio (foco), não tomando por base a quantidade de polens produzidos nas inflorescências. Isto implica que cultivares de notas para viabilidade de pólen diferentes (proporções diferentes) podem ter a mesma probabilidade na fecundação de outras

cultivares, ou ainda ocorrer um aumento na taxa de autofecundação. Assim, as cultivares RB86-7515 e a IAC91-1099, poderiam estar em desvantagem, em termos de quantidade de pólen, perante a IACSP95-5000. Com isto, seria interessante não somente avaliar o pólen das inflorescências pela nota de viabilidade (receptoras e doadoras), mas também pela quantidade de pólen produzida, pois aquelas que produzem menos que outras devem ser compensadas, no cruzamento, com um maior número de inflorescências.

A baixa produção de sementes viáveis para ambas as cultivares (RB86-7515 e a IAC91-1099) pode ser atribuída a diversos fatores entre eles: a baixa quantidade de polens viáveis envolvida no policruzamento, uma vez que apenas uma cultivar estaria contribuindo para a fecundação; temperaturas não ideais para a germinação; umidade abaixo de 85%; entre outros (BERDING, 1981; MOORE, 1987). Por outro lado, a não viabilidade encontrada nas sementes das cultivares IAC91-1099 e RB86-7515, a princípio, pode estar ligada a incompatibilidade com o pólen das outras cultivares (cromossômica) ou ainda a sensibilidade da parte feminina das flores às condições não ideais de realização do policruzamento (BABU, 2010). A hipótese de incompatibilidade pode ser descartada, uma vez que já foram obtidas sementes viáveis entre estas cultivares e a IACSP95-5000, em condições ideais para cruzamento, no Brasil (MAURO A. XAVIER comunicação pessoal, 2011). A hipótese mais coerente pode ser a de sensibilidade da parte feminina pelas condições desfavoráveis de temperatura e umidade.

Em relação à taxa de sobrevivência, comparando as progênies de autofecundação (oriundas da IACSP95-5000) com as de cruzamento (oriundas da SP89-1115) observa-se que, nas duas últimas avaliações (6 e 10 meses) a taxa de sobrevivência foi maior para as progênies oriundas de cruzamento. De fato, em plantas alógamas, a autofecundação pode levar a depressão por endogamia, ou seja, a perda de vigor na descendência ocasionada pelo aparecimento de genes deletérios e letais em condição homozigótica podendo ocasionar a morte de alguns indivíduos (FALCONER & MACKAY 1997).

Para a porcentagem de seleção foram escolhidas as plantas consideradas saudáveis, com bom desenvolvimento e perfilhamento, não levando em consideração as características produtivas, principalmente pela idade das plantas (10 meses). As progênies de cruzamento (oriundas da SP89-1115) apresentaram maior porcentagem de seleção em relação às progênies de autofecundação (IACSP95-5000) as quais apresentaram-se bem menos desenvolvidas e doentes. Resultado semelhante foi relatado por Silva e Gonçalves (2011), estudando a segregação na primeira geração de cultivares de cana-de-açúcar autofecundadas, em que, não foi observado perda geral nos atributos de produção (brix e pol), mas uma forte depressão por endogamia para as características de desenvolvimento da planta (altura e massa dos colmos).

CONCLUSÕES

De forma geral, pode-se concluir que a cultivar IACSP95-5000 se caracteriza como uma boa doadora de pólen nas condições de Ribeirão Preto, se comparada as outras cultivares aqui estudadas. Também, perante os resultados deste trabalho, a cultivar SP89-1115 mostrou-se receptora de pólen mesmo em condições ruins de temperatura e umidade. Com isso, notamos que a condição climática de Ribeirão Preto foi um fator limitante na execução do policruzamento, haja vista a baixa quantidade de sementes viáveis produzidas (baixo número de progênies), bem como a participação exclusiva da cultivar IACSP95-5000 na fecundação e formação destas. Isto implica que mesmo obtendo pólen viável nas condições naturais, a germinação pode ficar comprometida em condições desfavoráveis durante o cruzamento. Estes fatores poderão ser minimizados com a utilização da câmara de fotoperíodo, recentemente construída, em Ribeirão Preto, onde os fatores ambientais que regem o florescimento e a viabilidade do pólen são controlados, tanto na indução e formação das panículas como no momento do cruzamento. Além disso, a possibilidade de hibridação natural de cana-de-açúcar em Ribeirão Preto-SP existe, porém a taxa de cruzamento e a viabilidade das sementes formadas são muito baixas.

CAPÍTULO 3- COMPARAÇÃO ENTRE DOIS MÉTODOS DE COLORAÇÃO PARA VIABILIDADE DE PÓLEN EM INFLORESCÊNCIAS DA CANA-DE-AÇÚCAR.

RESUMO- O objetivo deste trabalho foi comparar a leitura da viabilidade do pólen por dois métodos de coloração executados em diferentes horários. Para isso foi avaliada a viabilidade polínica de quatro genótipos de cana-de-açúcar com dois corantes em três horários diferentes (6, 8, 9 h) bem como a germinação do pólen em meio de cultura. Para cada genótipo, três anteras maduras foram maceradas em lâmina de microscópio com uma gota do respectivo corante (iodo 0,1N e azul de lactofenol) e a porcentagem de viabilidade obtida em microscópio fotônico (250x). Esta foi comparada com a germinação do pólen em meio de cultura constituído de água de chuva, sacarose (300 g/L) e ágar-ágar (10 g/L) em placa de petri onde uma raquis de cada genótipo foi agitada suavemente. Foram realizadas três repetições para cada genótipo sendo que essas permaneceram em temperatura de 25°C e umidade do ar em torno de 95% por 30 min. Os dados foram comparados entre si pela análise de variância, pelo teste F (99% de probabilidade) e pelo teste t (95% de probabilidade). Os resultados apresentados revelam que o corante azul de lactofenol mostrou-se mais sensível à queda da viabilidade do pólen que ocorre naturalmente em cana-de-açúcar, diferentemente do corante de iodo. O corante de iodo se mostra mais estável e de mais fácil leitura em relação ao lactofenol para a classificação das inflorescências sendo possível a leitura em qualquer um dos horários avaliados. Ambos os corantes, superestimaram a viabilidade fornecida pela germinação em meio de cultura, quando realizada a leitura às 6 h.

Palavra-chave: Iodo, Lactofenol, germinação do pólen, hibridação, melhoramento.

INTRODUÇÃO

As flores de cana-de-açúcar são hermafroditas, porém suas quantidades de pólen viáveis podem variar entre as inflorescências. A ocorrência deste fato está ligada a fatores internos e externos, como o genótipo e condições ambientais diferentes na emissão das inflorescências. Desta forma, algumas inflorescências apresentam grande quantidade de pólen estéril (BRETT & HARDING, 1974; BERDING, 1981).

Em qualquer programa de melhoramento de cana-de-açúcar é essencial o conhecimento da capacidade da inflorescência de um genótipo em doar pólen. Isto é extremamente importante quando se deseja realizar cruzamentos para obtenção de sementes, onde uma inflorescência comporta-se como doadora e a outra somente como receptora (formadora de sementes) (BULL & GLASZIOU, 1975; CHEAVEGATTI-GIANOTTO et al., 2011; MC INTYRRE & JACKSON, 2001).

Além da classificação das inflorescências como doadora e/ou receptora, a viabilidade do pólen é essencial para a realização do cruzamento. Os métodos utilizados nos programas de melhoramento para identificar a viabilidade do pólen dos genótipos, vêm apresentando problemas que são visíveis no momento do teste de germinação (diminuição da porcentagem de germinação) realizado para verificação da efetividade dos cruzamentos (AMAYA, 1986). Além de outros fatores genéticos, a pequena participação de pólen viáveis no cruzamento exerce grande influência na diminuição da porcentagem de germinação, podendo estar relacionada com a ineficiência na prática de classificação das inflorescências, que precede a realização do cruzamento, como receptoras e doadoras.

No Brasil, entre os métodos mais utilizados entre os melhoristas de cana-de-açúcar está o método de coloração com iodo, que colore de azul escuro os polens considerados viáveis (MACHADO JR, 1987). Este método tem por característica a facilidade e rapidez em se classificar as inflorescências em doadoras e receptoras de pólen por meio da leitura em microscópio (PEDERSEN et al., 2004). Ele se baseia na coloração do amido presente no pólen (no entanto este não é o único fator limitante na germinação do tubo polínico) e por isto a confiança no método vem sendo muito

criticada entre os pesquisadores. Entretanto, por ser um método de baixo custo o mesmo vem sendo utilizado por muitos anos no Brasil.

De fato, a busca por métodos mais precisos e com a mesma rapidez da coloração do iodo seria muito importante para cruzamentos de melhor qualidade, o que garantiria sementes híbridas pela participação efetiva do pólen e um número desejável de sementes por panículas.

Em algumas culturas, como a do milho, o emprego de outro corante, denominado Azul de lactofenol, vem sendo utilizado com a finalidade de observar a viabilidade do pólen e obter uma predição sobre a ocorrência da fecundação na espiga, e conseqüentemente a futura formação de sementes. Este corante vem sendo muito utilizado para estudos de botânica e viabilidade de pólen de diferentes espécies (ASGHARI, 2000; KELLY et al., 2002; VIŽINTIN & BOHANEK, 2004; MANOHAR & MURTHY, 2011).

O método do Azul de lactofenol se baseia na coloração do citoplasma denso de células vivas, tornando os mesmos azuis, não colorindo aqueles que não possuem citoplasma ou o contem em baixa quantidade (RADFORD et al., 1974).

É necessário ressaltar a importância do horário da leitura da viabilidade do pólen de uma inflorescência já que é de conhecimento dos melhoristas que essa viabilidade, no caso da cana-de-açúcar, é sensível a temperatura e umidade, sendo as primeiras horas da manhã (temperaturas amenas e alta umidade) o melhor horário para se notar a viabilidade máxima do pólen nas inflorescências (BERDING, 1981; MOORE & NUSS, 1987; CHEAVEGATTI-GIANOTTO et al., 2011). De fato, nos programas de melhoramento, muitas vezes pelo grande número de cruzamentos realizados em um único dia, estas primeiras horas da manhã podem não serem suficientes para classificar todas as inflorescências, o que pode acarretar em erros nesta classificação.

Muitos trabalhos realizados com corantes (VIŽINTIN & BOHANEK, 2004; MANOHAR & MURTHY, 2011) mostram que embora seja um procedimento bem simples e de baixo custo este pode não fornecer informações sobre a capacidade de germinação do pólen, ou seja, a viabilidade real, a qual pode ser obtida por meio de testes de germinação em meios de cultura.

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi comparar a leitura da viabilidade do pólen de quatro genótipos de cana-de-açúcar por meio de dois corantes em três horários diferentes (6, 8, 9 h) com a germinação do pólen em meio de cultura a fim de verificar o melhor corante e horário de leitura para utilização nos programas de melhoramento de cana-de-açúcar.

MATERIAL E MÉTODOS

Material

Para a realização do experimento foram coletados quatro diferentes genótipos florescidos disponíveis no jardim varietal da estação de hibridação do Instituto Agrônomo de Campinas, localizada em Uruçuca no Estado da Bahia, Brasil. Estes genótipos apresentavam a mesma idade e mesmo tempo de florescimento estando aproximadamente 15% de suas flores já abertas.

Estes materiais após a coleta foram levados para local isolado onde foram mantidos em solução ácida segundo MANGELSDORF (1966) (150 ppm SO_2 , 75 ppm H_3PO_4 , 37 ppm H_2SO_4 , 37 ppm HNO_3) sendo que cada genótipo permaneceu em um balde distanciados por 1,5 m entre si. Esta solução conserva as inflorescências e mantém a viabilidade do pólen (HEINZ & TEW, 1987).

Avaliação da viabilidade do pólen

Para verificar a viabilidade do pólen das inflorescências de cada genótipo foram realizados a princípio dois métodos. Primeiramente, foi verificada a porcentagem de viabilidade por meio de dois métodos de coloração em três horários diferentes (6h, 8h e 9h) utilizando o corante iodo na concentração de 0,1 normal (MACHADO JR., 1987) e azul de lactofenol preparado de acordo com RADFORD et al. (1974). É importante ressaltar que os horários de leitura da viabilidade do pólen por meio desses corantes

foram escolhidos com base na rotina da maioria dos programas de melhoramento, que começa a ser realizada por volta das 6 horas da manhã.

Três anteras maduras (logo abaixo de flores abertas) foram maceradas com as respectivas soluções em lâmina e observadas em microscópio ótico (aumento de 250X) para leitura do percentual de polens viáveis. Para cada genótipo e corante testado foram preparadas três lâminas em cada horário diferente. A leitura da viabilidade com o corante de iodo utilizou-se a metodologia empregada por Machado Jr. (1987) onde polens corados em azul foram considerados viáveis e os amarelados inviáveis. Na leitura por meio de coloração com lactofenol, os polens considerados viáveis ficaram também corados em azul enquanto os inviáveis, branco (RADFORD et al., 1974; ASGHARI, 2000). O método de varredura foi utilizado até se alcançar o número total de 100 grãos de pólen por lâmina, em microscópio fotônico (250X de aumento) e em seguida determinada porcentagem de polens viáveis para cada corante.

Teste de germinação do grão de pólen em meio de cultura

O método utilizado para comparar com os corantes foi o da germinação do pólen em meio de cultura. Este experimento foi realizado às 5 horas da manhã, pois é o momento em que ocorre a maior viabilidade do pólen em cana de açúcar. O meio foi constituído de água de chuva, ágar-ágar e sacarose (CTC, comunicação pessoal), nas seguintes concentrações: 300g/litro de sacarose e 10g/litro ágar-ágar. Este meio foi despejado em placas de petri, cada uma dessas recebeu pólen de genótipo exclusivo. Para liberação do pólen no meio de cultura, uma raquis de cada genótipo foi agitada suavemente acima da placa de petri (todas as ráquis utilizadas possuíam flores no mesmo estágio de desenvolvimento). Foram realizadas três repetições para cada genótipo em temperatura de 25°C e umidade do ar em torno de 95% por 30 min. A contagem da porcentagem de polens germinados foi realizada em microscópio fotônico (aumento de 250X) após 30 min da instalação do experimento de germinação, onde se obteve a porcentagem de polens germinados por meio da contagem de 100 polens ao

acaso por placa (varredura). Somente foram considerados germinados aqueles que apresentavam tudo polínico maior que o diâmetro do pólen (WANG et al., 2004).

Análise estatística dos dados

As análises estatísticas foram conduzidas com o auxílio do software SAS (SAS INSTITUTE, 200), após a averiguação da normalidade e igualdade de variância. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste t no intervalo de confiança a 95%.

RESULTADOS

Avaliação da viabilidade do pólen com diferentes métodos de coloração e horários.

Os resultados das análises de variância mostraram que houve efeito significativo para todas as variáveis avaliadas (genótipo, horário e corante) bem como a ocorrência de interação entre elas (Tabela 1).

Tabela 1- Análises de variância para viabilidade de pólen de quatro genótipos de cana-de-açúcar em três horários diferentes (6, 8 e 9 horas) fornecida por meio de dois corantes (iodo e lactofenol).

Causas da Variação	G.L.	Quadrados Médios	F
Horário	2	413,514	145,95**
Genótipo	3	30273,852	10684,90**
Corantes	1	854,222	301,49**
HorárioXGenótipo	6	46,532	16,42**
HorárioXCorantes	2	301,264	106,33**
GenótipoXCorantes	3	102,519	36,18**
HorárioXGenótipoXCorantes	6	34,727	12,26**
Resíduo	48	2,833	
C. V. (%)			2,746

****: significativo (P < 0,01)

Desta forma, o desdobramento dos graus de liberdade da interação Horário X Genótipo X Corantes pelo teste t (95% de confiança) evidenciou que a viabilidade do pólen para o corante de iodo mostrou-se semelhante nos três horários, não diferindo para cada genótipo (Tabela 2).

Tabelas 2- Médias do teste de t (95%) para viabilidade de pólen de 4 genótipos de cana-de-açúcar em três horários diferentes (6, 8 e 9 h) fornecida por meio de dois corantes (iodo e lactofenol).

Horário	Genótipo	Viabilidade de pólen Iodo (%)	Viabilidade de pólen Lactofenol (%)
6h	I	0,666 I	1,000 I
	II	82,000 C	83,000 BC
	III	97,333 AB	95,666 A
	IV	83,000 BC	83,666 BC
8h	I	0,333 I	0,333 I
	II	77,333 D	69,000 F
	III	94,666 A	85,333 B
	IV	82,666 BC	73,666 E
9h	I	0,333 I	0,666 I
	II	81,000 C	61,000 H
	III	95,000 A	76,000 DE
	IV	82,333 C	64,666 G

Médias seguidas de mesma letra na vertical não diferem entre si pelo teste de T ($P > 0,05$).

A viabilidade do pólen para cada genótipo não variou com a mudança do horário de leitura com exceção do genótipo II que apresentou maior viabilidade as 6 e 9 h em relação às 8 h. Para o corante lactofenol, diferente do iodo, foi observado na análise do teste t uma diferença na viabilidade do pólen dos genótipos para os três horários avaliados, seguindo a sequência de maior viabilidade: 6, 8 e 9 h, exceto para o genótipo 1, que apresentou a mesma viabilidade nos três horários de leitura para este corante. O genótipo que apresentou maior viabilidade para os dois corantes foi o genótipo III e o

que apresentou menor foi o I, sendo esse fato verificado em todos os horários de leitura (Tabela 2). Comparando cada corante dentro de cada horário é possível notar que às 6 horas não houve diferença na viabilidade de pólen fornecida pelos dois corantes para cada genótipo estudado, porém para as 8 e 9 horas houve uma redução significativa da viabilidade do pólen de cada genótipo fornecida pelo corante lactofenol (Tabela 2).

Germinação do grão de pólen em meio de cultura x métodos de coloração

Comparando a germinação do pólen dos genótipos em meio de cultura com os dois corantes em cada horário pelo teste F, foi possível observar na análise de variância uma diferença significativa com 99% de probabilidade para genótipos e para os tratamentos (germinação em meio de cultura, viabilidade do pólen em azul de lactofenol, viabilidade do pólen em iodo) (Tabela 3).

Tabela 3- Análises de variância para viabilidade de pólen de 4 genótipos de cana-de-açúcar em três horários diferentes (6, 8 e 9 h) fornecida por meio de dois corantes (iodo e lactofenol) e pela germinação do pólen em meio de cultura.

Horários	Causas da variação	G.L.	Quadrados Médios	F
6 horas	Tratamentos	2	91,861	14,259**
	Genótipos	3	16519,657	158,302**
	Resíduo	30	7,431	
	C.V. (%)	4,95		
8 horas	Tratamentos	2	133,583	14,259**
	Genótipos	3	14830,593	1583,024**
	Resíduo	30	9,369	
	C.V. (%)	5,07		
9 horas	Tratamentos	2	620,861	33,376**
	Genótipos	3	13853,065	744,714**
	Resíduo	30	18,602	
	C.V. (%)	7,38		

** : significativo (P < 0,01)

Com a finalidade de comparar a germinação em meio de cultura (viabilidade real) com os corantes estudados quanto à viabilidade do pólen nos horários de leitura, os graus de liberdade dos tratamentos foram desdobrados aplicando o teste T a 95% de probabilidade (Tabela 4).

Tabela 4- Médias do teste de T (95%) para viabilidade de pólen de 4 genótipos de cana-de-açúcar em três horários diferentes (6, 8 e 9 horas) fornecida por meio de dois corantes (iodo e lactofenol) comparados à germinação em meio de cultura.

	6 horas	8 horas	9 horas
Tratamentos	Viabilidade do pólen (%)	Viabilidade do pólen (%)	Viabilidade do pólen (%)
Meio de Cultura	60,167 B	60,167 B	60,167 B
Iodo (1N)	65,750 A	63,730 A	64,667 A
Azul de Lactofenol	65,830 A	57,083 C	50,583 C

Médias seguidas de mesma letra na vertical não diferem entre si pelo teste de T(P > 0,05).

O desdobramento revelou que a viabilidade do pólen fornecida pelos dois corantes não diferiram perante a viabilidade do pólen para o horário das 6 horas, contudo diferiram significativamente da germinação em meio de cultura, que apresentou menor média de viabilidade do pólen. Para os horários das 8 e 9 h o corante de Iodo forneceu maior média de viabilidade diferindo significativamente da germinação em meio de cultura que apresentou média intermediária. O lactofenol ofereceu a menor média da viabilidade do pólen.

DISCUSSÃO

De uma forma geral pelos resultados apresentados, o corante de azul de lactofenol foi o único que apresentou diferença na viabilidade do pólen para os

genótipos estudados nos 3 horários diferentes, com exceção do genótipo I que por ter obtido uma viabilidade de pólen muito baixa já no primeiro horário de leitura não apresentou diferença nos outros dois horários.

O corante azul de lactofenol mostrou maior sensibilidade ao detectar que a viabilidade do pólen decaiu com o aumento do horário de leitura. De fato a viabilidade do pólen de cana-de-açúcar é efêmera e muito sensível em relação umidade e temperatura do ambiente, apresentando uma meia vida média de 12 min após a dispersão (SARTORIS, 1942; SCARPARI & BEAUCLAIR, 2008). Neste trabalho a queda na viabilidade possivelmente ocorreu pela diminuição da umidade que ocorre naturalmente durante o dia, e não pela temperatura que se manteve ideal em torno de 25 °C. A sensibilidade do corante de iodo foi diferente da encontrada para o azul de lactofenol. Este primeiro, de uma maneira geral mostrou a mesma viabilidade do pólen nos diferentes horários de leitura. Isto pode ter ocorrido pela diferença na forma de coloração do pólen viável pelos dois corantes. O corante de iodo somente se baseia no amido que está presente, na sua maioria, em polens considerados viáveis, porem este pode estar presente em polens abortados (KING, 1960; BEYHAUT 1988; RODRIGUEZ-RIANO & DAFNI, 2000). Já o corante de azul de lactofenol tem afinidade com o citoplasma do pólen, encontrado em polens vivos, o que não garante a germinação (NEPI & FRANCHI, 2000). No entanto, este corante detectou a queda da viabilidade com a mudança do horário de leitura, possivelmente, por avaliar alterações no citoplasma do pólen que perde a viabilidade.

Devido à baixa longevidade dos polens da cana-de-açúcar, como na maioria das plantas pertencentes à família Poacea (HANNA & TOWILL, 1995) a germinação destes é comprometida com o passar das horas e por isto sugere-se que o teste de germinação seja realizado às 5 horas da manhã, pois neste período, as plantas estão túrgidas e as anteras expostas com a maior viabilidade dos polens ali contidos (MOORE, 1987). A dificuldade de se obter germinação após este período pode estar ligada a perda de água e a manutenção do estado de desidratação em condições naturais do pólen (LISCI et al., 1994; NEPI & PACINI, 1993). Porém os programas de melhoramento começam a leitura da viabilidade por volta das 6 h da manhã, e devido

ao fato do grande número de inflorescências para ser classificadas fica difícil não estender a leitura da viabilidade por mais algumas horas.

Na comparação da germinação do pólen em meio de cultura com os dois corantes, observou-se que no horário das 6 horas, os dois corantes superestimaram a verdadeira viabilidade do pólen (obtida pela germinação em meio de cultura), e isto pode ser corroborado em diversos trabalhos encontrados na literatura com outros corantes (KING, 1960; HESLOP-HARRISON & HESLOP-HARRISON 1970; STANLEY & LINSKENS, 1974; RODRIGUEZ-RIANO & DAFNI, 2000;). O corante de iodo forneceu a mesma viabilidade de pólen nos três horários superestimando a germinação, o que não aconteceu para o corante azul de lactofenol que subestimou a germinação nestes horários. Nenhum dos dois corantes forneceu a viabilidade de pólen semelhante a da germinação, e por isto não foi possível estimar qual foi o melhor horário de leitura desta.

Contudo, para a realização dos cruzamentos é importante que não se subestime a viabilidade do pólen já que isso pode acarretar em uma equivocada classificação das inflorescências e, conseqüentemente, um aumento na chance de autofecundação e formação de sementes inviáveis, o que não é interessante para os programas de melhoramento de cana-de-açúcar.

O corante de iodo mostrou maior estabilidade que o de lactofenol com o passar do tempo de leitura da viabilidade. Além disso, este teve um contraste maior entre os possíveis polens viáveis e não viáveis facilitando a leitura. O corante azul de lactofenol, não revela o mesmo contraste já que o mesmo colore diretamente as diferentes quantidades de citoplasma da célula mostrando diferentes tons de azul, o que dificulta a leitura. Desta forma, apesar do azul de lactofenol mostrar-se sensível a diminuição da viabilidade do pólen, o iodo pode ser considerado mais estável e de maior facilidade de leitura.

CONCLUSÕES

Com os resultados apresentados é possível concluir que nenhum dos horários de leitura da viabilidade fornece resultados semelhantes à viabilidade do pólen fornecida

pela germinação em meio de cultura. Apesar de superestimar esta viabilidade, o corante de iodo se mostra mais estável e de mais fácil leitura em relação ao lactofenol para a classificação das inflorescências sendo possível a leitura em qualquer dos horários avaliados.

CAPÍTULO 4- FLORESCIMENTO DE GENÓTIPOS DE CANA-DE-AÇÚCAR SUBMETIDOS A DIFERENTES TRATAMENTOS FOTOPERIÓDICOS EM CÂMARA DE FOTOPERÍODO NO BRASIL

RESUMO - Este trabalho teve por objetivo avaliar o comportamento de 16 genótipos quando expostos a diferentes tratamentos fotoperiódicos indutivos ao florescimento. Cada um dos 16 genótipos foram plantados em vasos de 43 litros com proporções iguais de terra, substrato (Plantimax[®]) e areia onde se mantiveram três perfilhos. Ao atingirem de 4 a 6 internódios, foram levados para três vagões localizados em uma Câmara de Fotoperíodo, sendo que cada vagão continha todos os 16 genótipos dispostos aleatoriamente. Cada um destes vagões constituiu um tratamento fotoperiódico de 30 s, 45 s, 1 min de decaimento diário partindo de 12 h e 55 min de luz. A faixa de temperatura (21 a 32 °C) e a umidade (irrigação, capacidade de campo) permaneceram a mesma para todos os tratamentos. A indução teve início em setembro de 2010 e término em abril de 2011. A partir disso, observações como estiolamento das plantas, data da emissão da folha bandeira e da inflorescência foram anotadas. Foi realizada também a leitura da viabilidade do pólen destas inflorescências por meio de coloração com solução de iodo (0,1N). A Câmara de fotoperíodo promoveu condições ideais para o florescimento e a viabilidade de pólen, visto que, os três tratamentos tiveram sucesso no florescimento de genótipos de cana-de-açúcar, mesmo em fotoperíodo natural adverso para indução floral. Os materiais que repetiram o florescimento em diferentes tratamentos se comportam de maneira diferente na data de emissão da panícula de um tratamento para o outro. Dados como estes podem facilitar os sincronismos de florescimentos para cruzamentos desejados, além de gerar informações para os programas de introgressão genética envolvendo cultivares comerciais e espécies do Complexo *Saccharum*.

INTRODUÇÃO

O cruzamento da cana-de-açúcar no Brasil sempre foi realizado em condições naturais na região litorânea do Nordeste, por apresentar clima ideal para a indução floral. Entretanto, atualmente os pesquisadores têm encontrado dificuldades em obter o sincronismo da floração em cruzamentos específicos, por exemplo, envolvendo material comercial com acessos de *Saccharum spontaneum* visando a introgressão de genes para aumentar a base genética da cana-de-açúcar, bem como os teores de fibra e biomassa.

O processo de formação da inflorescência é de difícil definição, pois depende do indivíduo, do clima e das mudanças que ocorrem nos anos agrícolas. O estímulo para o florescimento pode ocorrer durante 18 a 25 dias (CLEMENTES & AWADA, 1965) e para o hemisfério sul, a diferenciação do meristema para a formação da inflorescência ocorre nos meses de fevereiro, março e abril, sendo que o florescimento ocorre nos meses de abril, maio e junho (HUMBERT, 1974; SRIVASTAVA et al., 2006).

São muitos os fatores externos que influenciam na indução do florescimento, entre eles se destaca o fotoperíodo. A cana-de-açúcar assume característica de planta de dias curtos, porém, para a indução do florescimento, somente estes não são suficientes, sendo necessárias sucessivas noites longas para ocorrência do mesmo (TAIZ & ZAIGER, 2009). O comprimento do dia ideal para o florescimento parece ser de 12 h e 55 min sendo esse horário adotado para a maioria das cultivares plantados no mundo (BERDING, 1981). Mesmo em locais em que ocorrem condições de fotoperíodo indutivo, a emissão de inflorescências pode não ser uniforme todos os anos, revelando que não somente este fator está ligado ao florescimento, mas também outros, como a temperatura (AUSTRALIAN GOVERNMENT, 2011). Acredita-se que nos locais de ocorrência de abundante florescimento, a temperatura mínima raramente fica abaixo de 18 °C e as máximas nunca ultrapassam os 32 °C (BERDING, 1995) e que temperaturas abaixo de 21 °C podem atrasar o crescimento e a emergência da panícula (CLEMENTS & AWADA, 1967).

Assim como o desenvolvimento da panícula é sensível à temperatura, a viabilidade do grão de pólen também é afetada por ela, sendo que temperaturas baixas podem tornar o grão de pólen inviável. De fato, temperaturas noturnas abaixo de 15 °C, antes ou durante o florescimento podem causar aborto das anteras, tornando assim as cultivares macho estéreis (BERDING, 1981).

Outro fator de influencia importante na ocorrência do florescimento da cana-de-açúcar é a umidade do solo que pode afetar o pendoamento, pois o déficit hídrico durante o ciclo indutivo atrasa o florescimento. Isto acontece pois a falta de água inibe a translocação de fotoassimilados para o ápice para que ocorra o alongamento do pedúnculo da inflorescência bem como compromete a exposição das anteras (MOORE & NUSS, 1987; NAYAMUTH et al., 2003;). Manejar as condições fotoperiódicas e de temperatura visando sincronizar a emissão da panícula no momento correto para o cruzamento de variedades escolhidas foi uma das alternativas encontradas por Nils Berding na Austrália, por Nuss na África do Sul e Paul Moore no Havaí, para a realização de cruzamentos em locais cujas condições não são favoráveis ao florescimento naturalmente. Pensando desta forma, através do projeto BIOEN-Fapesp (08/56146-5) foi construída a primeira câmara de fotoperíodo totalmente automatizada do Brasil (SCARPARI et al., 2011) capaz de simular as condições ideais de fotoperíodo e temperatura para induzir o florescimento da cana-de-açúcar de forma controlada.

Devido à inconstância do florescimento e viabilidade do pólen que ocorrem no Estado de São Paulo de forma natural, estudos de técnicas que sincronizam artificialmente o florescimento e mantenham a viabilidade do pólen tem grande importância para os programas de melhoramento. Além disso, no Brasil, ainda não se conhece o fotoperíodo indutivo dos genótipos brasileiros bem como a resposta destes a diferentes tratamentos indutivos artificiais, pois não há trabalhos desenvolvidos na área de indução de florescimento em câmara de fotoperíodo.

Assim sendo, este trabalho teve como objetivo analisar o comportamento de 16 genótipos utilizados no programa de melhoramento de cana do Instituto Agrônomo de Campinas quando expostos a diferentes tratamentos fotoperiódicos indutivos ao florescimento para gerar informações que possam contribuir para futuros sincronismos

e cruzamentos planejados, além de gerar informações para os programas de introgressão genética envolvendo cultivares comerciais e espécies do Complexo *Saccharum*.

MATERIAL E MÉTODOS

Material

O experimento foi conduzido no Instituto Agrônomo de Campinas - Centro de Cana, em Ribeirão Preto-SP, no período de setembro de 2010 a abril de 2011. Neste, 16 genótipos com características relevantes para alta sacarose e teor de fibra foram estudados quanto à indução de floração de acordo com a exposição a tratamentos fotoperiódicos diferentes.

Tabela1- Genótipos estudados quanto ao comportamento a fotoperíodo indutivo ao florescimento.

GENÓTIPOS			
IACSP94-2101	SP89-1115	CTC12	IACSP97-2055
IACSP93-2060	RB867515	CTC8	IACSP95-5094
IACSP96-7569	IACSP00-8095	CTC6	SP90-1638
SP80-1842	IACSP00-8206	CTC15	CO213

Instalação do experimento

Os 16 materiais foram plantados previamente em vasos de 43 litros com medidas iguais de solo argiloso, areia média, substrato (Plantmax[®]) e adubação recomendada, mantendo-se sempre três perfilhos de cada material, assim garantiu-se a uniformidade dos materiais estudados. Os vasos com os genótipos foram colocados, aleatoriamente, em três vagões com mobilidade (entrada e saída) sendo cada vagão acoplado a um

compartimento com condições de fotoperíodo controlado representando os tratamentos (Figura 1).



Figura 1- Imagem externa da Câmara de fotoperíodo.

A indução deu início quando os cultivares apresentaram de 4 a 6 internódios bem formados, garantindo a maturidade para o florescimento (COLEMAN, 1969; CLEMENTS & AWADA, 1967; NUSS, 1978 ; BABU, 2010).

Indução do florescimento

Os tratamentos foram de 30 s (Tratamento I), 45 s (Tratamento II) e 1 min (Tratamento III) de decaimento fotoperiódico diário partindo-se de 12 h e 55 min

(BERDING, 1995; MOORE & NUSS 1987). Este decaimento persistiu até o fim do experimento.

Para o controle fotoperiódico, a luminosidade dos ambientes internos foi controlada pela combinação de lâmpadas incandescentes e fluorescentes programadas para ligar e desligar a qualquer momento simulando inclusive o nascer e o pôr do sol, com possibilidade de redução diária no tempo de fotoperíodo. O movimento de abertura e fechamento das portas para cada ambiente isolado e a entrada e saída dos vagões foram realizados de forma automática de acordo com o período de luz programado bem como com a temperatura externa. A temperatura foi controlada no intervalo de 22 a 32 °C, com ponto ótimo de controle a 27 °C internamente para os três tratamentos, sendo correlata com a temperatura externa. Para isto, condicionadores de ar reversíveis (quente/frio) foram instalados em cada ambiente interno e dispositivos que podiam detectar a temperatura foram colocados dentro e fora da Câmara de Fotoperíodo. É importante ressaltar que todos os componentes são automatizados o que permitiu as condições ideais de indução e florescimento das plantas.

A indução das plantas iniciou-se em setembro de 2010, e a partir desta data foram realizadas avaliações diárias até final de abril de 2011. Toda mudança morfológica nas plantas consideradas início de florescimento (início do estiolamento das plantas e data da emissão da folha bandeira) quando observadas foi anotada (datas) durante todo o período de indução. A data da emissão da panícula também foi anotada. É importante ressaltar que no período da emissão das inflorescências estas permaneceram em umidade relativa maior que 70% (período intenso de chuva).

As inflorescências emitidas foram levadas para laboratório para verificar se estas apresentavam viabilidade de pólen em condições de indução artificial de florescimento. Para isto, anteras maduras foram maceradas com solução de iodo 0,1N, o que permitiu a visualização da porcentagem de polens azulados perante o total apresentado no foco, e assim qualificar as inflorescências como receptoras ou doadoras (MACHADO JR, 1987). De acordo com o número de polens azulados classificou-se as inflorescências por meio de nodas que variavam de 1 a 9, sendo 1 utilizada como inflorescência doadora e 9 como inflorescência receptora (MACHADO JR., 1987) (Tabela 2).

Tabela 2- Notas de viabilidade de pólen baseadas na coloração de pólen azulados (%) por meio solução de iodo a 0,1N.

Polens azulados (%)	Nota
0	9
1 a 9	8
10 a 19	7
20 a 40	6
41 a 60	4
61 a 80	3
81 a 99	2
100	1

RESULTADOS

Aos 60 dias após o início dos tratamentos para a indução do florescimento, foi observado o primeiro indício de indução característico da espécie que é o estiolamento das plantas, o que mostrou que os genótipos estavam respondendo aos tratamentos.

Nos tratamentos I (30 s) e II (45 s), notadamente, entre os perfilhos de um mesmo material, alguns genótipos mostraram-se mais altos (estiolamento) levando a uma desuniformidade visual maior entre as plantas nestes tratamentos comparativamente ao tratamento III (1min).

De forma geral, o período de emissão da folha bandeira foi dos 110 aos 179 dias do início da indução, e a emissão das inflorescências se deu no período de 137 a 207 dias após o início da indução (Tabela 3) incluindo todos os três tratamentos. O primeiro genótipo a emitir a folha bandeira foi o CTC 8 aos 110 dias após a indução, e o primeiro a emitir a inflorescência foi o CTC12 aos 137 dias ambos no tratamento II (45 s). Foi observado que nem todos os genótipos que apresentaram folha bandeira chegaram a emitir a inflorescência. Além disso, a emissão da folha bandeira não

ocorreu para todos os perfilhos no vaso sendo que os únicos genótipos que apresentaram todos os três perfilhos com sinal de indução (folha bandeira) foram SP80-1842 (trat. II), SP89-1115 (trat. I), CTC12 (trat. II), CTC8 (trat. I e II) e IACSP95-5094 (trat. I e II) (Tabela 3).

Tabela 3 – Dias de indução fotoperiódica artificial até emissão de folha bandeira e inflorescência em 16 diferentes genótipos em três tratamentos diferentes.

GENÓTIPOS	Dias de indução																	
	Emissão da folha bandeira									Emissão da inflorescência								
	TRATAMENTO I			TRATAMENTO II			TRATAMENTO III			TRATAMENTO I			TRATAMENTO II			TRATAMENTO III		
	PERFILHOS	PERFILHOS	PERFILHOS	PERFILHOS	PERFILHOS	PERFILHOS	PERFILHOS	PERFILHOS	PERFILHOS	PERFILHOS	PERFILHOS	PERFILHOS	PERFILHOS	PERFILHOS	PERFILHOS	PERFILHOS	PERFILHOS	PERFILHOS
1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
IACSP94-2101	154																	
IACSP93-2060	144						179	179										
IACSP96-7569	117	134		155			139	140	154	159		159					177	
SP80-1842				139	150	152						159	175					
SP89-1115	117	119	132	116	132				154	172		193	154					
RB86-7515				146	149													
IACSP00-8095	139	148							154	165								
IACSP00-8206	124	147		144	145							186	190					
CTC12	139			116	117	117			174			137	141	148				
CTC8	117	118	151	110	110	111			140	146	192	140	146	152				
CTC6				168	172													
CTC15	144	149																
IACSP97-2055	140	151																
IACSP95-5094	140	142	142	133	144	153	152	157	182	159	173	192				198	207	
SP90-1638				139								193						
CO213				133								154						

Nos genótipos IACSP00-8095, CTC12, CTC8, SP901638 e CO213 a emissão da inflorescência ocorreu para todos os perfilhos induzidos independente dos tratamentos (Tabela 3).

O número de genótipos que emitiram a folha bandeira foi diferente para os tratamentos estudados. No tratamento I e II foram 11 os genótipos que apresentaram a emissão da folha bandeira, já no tratamento III, 3 genótipos.

Não somente o número de genótipos que emitiram a folha bandeira foi diferente nos tratamentos estudados, mas também a número de genótipos que emitiram a inflorescência. No tratamento I, 6 genótipos floresceram, 9 no tratamento II e 2 no III. Desta forma, é possível afirmar que nem todos os genótipos que emitiram a folha bandeira em qualquer um dos tratamentos, também emitiram a inflorescência (Tabela 3). Os tratamentos I e II apresentaram genótipos que floresceram exclusivamente para estes. No tratamento I a exclusividade ocorreu para o genótipo IACSP00-8095 e no II para os genótipos SP801842, IACSP00-8206, SP901638 e CO213.

Os dias de indução tanto para emissão da folha bandeira quanto a inflorescência, de uma forma geral, foram diferentes para os perfilhos dentro de um mesmo genótipo (Tabela 3). Na tabela 4 são apresentados o tempo em dias dos genótipos com a folha bandeira para emissão da inflorescência.

Tabela 4- Tempo em dias da emissão da inflorescência a partir da emissão da folha bandeira de 16 genótipos de cana-de-açúcar em condições de indução de florescimento.

Dias de indução									
Emissão da inflorescência a partir da folha bandeira									
GENÓTIPOS	TRATAMENTO I			TRATAMENTO II			TRATAMENTO III		
	PERFILHOS			PERFILHOS			PERFILHOS		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
IACSP94-2101									
IACSP93-2060									
IACSP96-7569	37	25		4			38		
SP801842				20	25				
SP891115	37	53		77	22				
RB867515									
IACSP00-8095	15	17							
IACSP00-8206				42	45				
CTC12	35			21	24	31			
CTC8	23	28	41	30	36	41			
CTC6									
CTC15									
IACSP97-2055									
IACSP95-5094	42	17	31	59			46	50	
SP901638				54					
CO213				21					

Desta forma, o genótipo que apresentou menor tempo entre a emissão da folha bandeira e o florescimento propriamente dito foi o IACSP96-7569, com quatro dias no tratamento II. Em contrapartida, o tratamento que levou o maior tempo para emitir a inflorescência também ocorreu no tratamento II, sendo o SP89-1115 com 77 dias.

Nota-se que o tempo entre a emissão da folha bandeira e o florescimento não variou somente entre os genótipos mas também entre os perfilhos dos mesmos dentro dos tratamentos (Tabela 4).

A emissão das inflorescências não garante a realização dos cruzamentos, para isto estas devem apresentar alta viabilidade de pólen. A tabela 5 mostra a viabilidade de pólen em forma de nota (1-9) que foi encontrada nas inflorescências dos genótipos estudados.

Tabela 5- Notas de viabilidade do pólen dos genótipos que emitiram inflorescências em condições de indução de florescimento.

GENÓTIPOS	Notas para viabilidade do pólen (1-9)								
	TRATAMENTO I PERFILHOS			TRATAMENTO II PERFILHOS			TRATAMENTO III PERFILHOS		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
IACSP94-2101									
IACSP93-2060									
IACSP96-7569	4	6		4			4		
SP801842				1	1				
SP891115	8	9		8	8				
RB867515									
IACSP00-8095	2	2							
IACSP00-8206				4	4				
CTC12	2			3	3	3			
CTC8	1	1	2	1	2	2			
CTC6									
CTC15									
IACSP97-2055									
IACSP95-5094	2	2	2	3			2	2	
SP901638				2					
CO213				2					

As notas de viabilidade variaram de 1-9 nas inflorescências emitidas, ou seja, haviam receptoras e doadoras de pólen garantindo assim cruzamentos. Os genótipos

que apresentaram notas de alta viabilidade de pólen (notas 1 e 2) foram o SP80-1842 (trat.II), IACSP00-8095 (trat. I), CTC12 (trat. I), CTC8 (trat. I e II), IACSP95-5094 (trat.I e III), SP90-1638 (trat.II) e o CO213 (trat. II).

Alguns genótipos apresentaram notas intermediárias de viabilidade de pólen (3, 4), podendo ser utilizados como doadores, ou serem emasculados para receberem pólen no cruzamento. Estas notas foram observadas nos genótipos IACSP96-7569 (trat. I, II e III), IACSP00-8206 (trat. II), CTC12 (trat. II) e IACSP95-5094 (trat. II).

Os materiais que apresentaram notas de viabilidade baixa (6, 7, 8, 9) e que são considerados receptores de pólen, por possuírem baixa probabilidade de autofecundação foram o IACSP96-7569 (trat. I) e o SP89-1115 (trat. I e II).

De uma forma geral, os genótipos não obtiveram grande variação em relação às notas de viabilidade de pólen perante aos diferentes tratamentos e entre os perfilhos do mesmo genótipo, apresentando sempre notas similares quando expostos aos diferentes tratamentos mesmo em épocas não iguais de florescimento.

DISCUSSÃO

A indução floral é observada antes mesmo da emissão da panícula pelo estiolamento das plantas (alongamento do colmo), brotações laterais e emissão da folha bandeira. Segundo Barbieri e Villa Nova (1981) citados por GOMES et al. (2004), o tamanho do colmo aumenta quando o comprimento do dia varia entre 10 e 14 h, o que ocorre em fotoperíodo indutivo (RODRIGUES, 1995; GOMES et al., 2004). A desuniformidade entre os perfilhos dos vasos nos tratamentos I e II pode estar relacionada a este estiolamento ocasionado pelo fato da maior parte da indução ter ocorrido nos dois primeiros tratamentos, sendo que no tratamento III obteve-se a menor quantidade de plantas induzidas em relação aos outros, mostrando-se mais uniforme.

É importante ressaltar que o período de indução ocorreu em uma época normalmente não recomendada, já que nesta, o fotoperíodo natural é crescente, o

oposto necessário à indução floral da cana-de-açúcar. Mesmo assim, se obteve indução e emissão floral, que de uma maneira geral, adiantou o florescimento em aproximadamente 90 dias comparada às condições naturais. Além disso, os tratamentos de decaimento fotoperiódico utilizados em outros países funcionaram para os genótipos brasileiros. Isto mostra que, realmente a manipulação dos fatores que regem o florescimento pode evidentemente fazer com que se obtenham flores durante qualquer período do ano, facilitando o sincronismo do florescimento e permitindo um melhor planejamento de cruzamentos especiais.

De fato, o surgimento da folha bandeira é certamente um indício que a planta de cana-de-açúcar está induzida ao florescimento, pois esta é considerada uma etapa visível que antecede a emissão da flor (RODRIGUES, 1995). Porém, de acordo com as observações diárias deste trabalho, o aparecimento desta não prevê a data de florescimento. Isto porque muitos genótipos que apresentaram a folha bandeira anteriormente a outros, não necessariamente floresceram antes destes. Ainda, neste experimento, o tempo entre emissão da folha bandeira e o florescimento de um mesmo genótipo em tratamentos diferentes, foi diferente, o que indica que os tratamentos fotoperiódicos podem interferir neste período.

Uma das dificuldades encontradas no presente trabalho foi a desuniformidade na indução e florescimento dos genótipos dentro e entre tratamentos, o que merece mais estudos com repetições e mais tratamentos. Sabe-se que diferentes cultivares se comportam diferentemente em relação ao número de dias necessários dentro do período indutivo para a formação do estímulo floral (COLEMAN, 1969). A quantidade necessária desse estímulo pode levar à diferenciação da panícula no início ou no final do período indutivo.

A desuniformidade do florescimento é observada em canaviais comerciais quando se percebe que cultivares induzidas podem emitir as inflorescências todas em um mesmo período ou por etapas. A verdade deste fato está na classificação destas perante a intensidade de florescimento pelos programas de melhoramento genético da espécie. Esta desigualdade está ligada a idade fisiológica dos colmos, que pode ser mais uniforme ou desuniforme dependendo do genótipo. Assim, por mais que o plantio

dos genótipos tenha sido em mesma época, os perfilhos de cada genótipo possivelmente poderiam estar em idade fisiológica diferente, e dessa forma a indução diferenciada dos mesmos. Isto poderia ser minimizado utilizando tubetes com uma gema cada, desta forma, teria mais repetições com a mesma idade fisiológica.

O fato de alguns genótipos florescerem em mais de um tratamento não indica necessariamente que um seja melhor que o outro, pois os florescimentos aconteceram em diferentes datas, o que pode facilitar a escolha de um genótipo para um cruzamento.

Com a câmara de fotoperíodo foi possível a obtenção de pólen viável, o que permitirá a futura realização de cruzamentos em Ribeirão Preto, região anteriormente desconsiderada para isso. É evidente que isto ocorreu pela uniformidade de temperatura e umidade em que permaneceram os três tratamentos, e isto corrobora com a uniformidade das notas de viabilidade de pólen dos perfilhos de um mesmo genótipo entre e dentro dos tratamentos.

A uniformidade das notas de viabilidade de pólen sugere estar ligada ao genótipo, pois todas as plantas permaneceram em condições iguais de umidade e temperatura, sendo alterado apenas o tratamento fotoperiódico. Já é percebido entre os melhoristas, que a quantidade de pólen viável produzida pode variar entre genótipos. Além disso, aquelas que, uma vez classificadas como receptoras ou doadoras, raramente muda o sua classificação de uma campanha de hibridação para outra. Porém, a amplitude de temperatura de 21 °C a 32 °C e umidade maior de 70% pode não ser a adequada para todas as variedades, exigindo maiores estudos distinguindo os genótipos perante este fator, ou seja, estudos específicos para verificar a possibilidade de uma receptora tornar-se uma doadora com certo manejo correto da temperatura e umidade específica para este genótipo. Na literatura trabalhos evidenciam que a viabilidade do pólen de cana-de-açúcar, de uma forma geral, se mantém em condições de 21-32 °C e umidade de 67% (MOORE, 1987), mas não foi possível encontrar relatos de trabalhos específicos para identificar diferença entre genótipos.

CONCLUSÕES

A Câmara de fotoperíodo promoveu condições para o florescimento e viabilidade de pólen, visto que, pelo menos dois dos tratamentos estudados tiveram a emissão do florescimento de genótipos de cana-de-açúcar, mesmo em fotoperíodo natural adverso. Os materiais que repetiram o florescimento se comportam de maneira diferente na data de emissão da panícula de um tratamento para o outro, o que pode facilitar os sincronismos de florescimentos para cruzamentos desejados. Conclui-se ainda que a emissão da folha bandeira não indica o momento em que a planta emitirá a inflorescência, porém esta precede o florescimento. A câmara de fotoperíodo será uma valiosa ferramenta para entender a fisiologia do florescimento bem como estudos de sincronismos e planejamentos de cruzamentos especiais.

Ainda, neste trabalho, como sugestão de melhoria para os próximos experimentos poderão ser utilizados vasos menores com uma única gema, não permitindo o perfilhamento dos genótipos para que todos possuam a mesma idade fisiológica, além da utilização de repetições para melhor avaliação dos tratamentos indutivos e do comportamento dos genótipos avaliados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXANDER, A.G. **Sugarcane physiology**. Amsterdam: Elsevier Scientific Publishing.1973. 752p.

AL-JANABI, S. M.; FORGET ,L.; DOOKUN, A. An Improved and Rapid Protocol for the Isolation of Polysaccharide- and Polyphenol-Free Sugarcane DNA. **Plant Molecular Biology Reporter**, Atenas, v.17, p. 1–8, 1999.

AMAYA, E.A. Mejoramiento de la caña de azúcar. In: BUENAVENTURA, C. (Ed.). **El cultivo de la caña de azúcar**. Cali: Tecnicaña, 1986. p.41-52.

AMORIN, E.P. **Produtividade de híbridos de milho, derivados de populações S₀, e associação com distância genética baseada em microssatélites**. 2005. 97f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.

APPEZZATO-DA-GLORIA, B.; CARMELO-GUERREIRO, S.M. **Anatomia vegetal**. 2ª ed. Viçosa: UFV, 2006. 438p.

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

ASGHARI, J. Estimation of Pollen Viability of Metsulfuron Treated Dyers Woad (*Isatis tinctoria*) for Herbicide Efficacy Evaluation. **Journal of Agriculture, Science and Technology**, Tehran, v. 2, p. 85-93. 2000.

ASKER, S.; L. JERLING. **Apomixis in plants**. Boca Raton: CRC Press. United States. 1992. 298p.

AUSTRALIAN GOVERNMENT. **The Biology and Ecology of Sugarcane (Saccharum spp. hybrids) in Australia**. Disponível em: <[http://www.ogtr.gov.au/internet/ogtr/publishing.nsf/content/sugarcane-3/\\$FILE/biologysugarcane.pdf](http://www.ogtr.gov.au/internet/ogtr/publishing.nsf/content/sugarcane-3/$FILE/biologysugarcane.pdf)>. Acesso em: 12 dez., 2011.

BABU, C. N. **Sugarcane**. 2 ed.Gandhi Nagar: Allied Publishers, 2010. 252p.

BERDING, N.; MOORE, P.H. Advancing from opportunistic sexual recombination in sugarcane : Lesons from tropical photoperiodic research. **Proceedings of International Society of Sugar Cane Technologists**, Mauritius, v.24, p.482-487, 2001.

BERDING, N. Improved flowering and pollen fertility in sugarcane under increased night temperature. **Crop Science**, Madison, v.21, p.863-867, 1981

BERDING, N. Improving flowering through breeding: progress and prospects. **International Society of Sugar Cane Technologists**, Mauritius, v.17, p.162-171, 1995.

BERDING, N.; HURNEY, A.P. Flowering and lodging, physiological-based traits affecting cane and sugar yield. What do we know of their control mechanisms and how do we manage them?. **Field Crops Research**, Amsterdam, v.92, p. 261–275, 2005.

BEYHAUT, R. **Estúdio comparado de dos técnicas para viabilidade polen en *Vitis vinifera***. Notas Técnicas, 5, 1988. Faculdade de Agronomia, Montevideo, 1988.

BORÉM, A.; CAVASSIM, J.E. Blocos de Cruzamento. In: BORÉM, A. **Hibridação Artificial em Plantas**. Viçosa: UFV, 1999, cap.2, p.15-61.

BRAVO, J.A.; FEHR, W.R.; CIANZIO, S.R. Use Of Small-Seeded Soybean Parents for the Improvement of Large-Seeded Cultivars. **Crop Science**, Madison, v.21, p.430-432, 1981.

BRETT, P.G.C.; HARDING, R.L. Artificial induction of flowering in Natal. **Proceedings of International Society of Sugar Cane Technologists**, Mauritius, v.15, p. 55-66, 1974.

BULL, T. A.; GLASZIOU, K. T. Sugar cane. In: EVANS, L. T. **Crop physiology: Some case histories**. Cambridge: University Press, 1975, cap. 3, p.51-72.

CABRAL, F. F. **Qualidade fisiológica, determinação do teor de água, e armazenamento de sementes de cana-de-açúcar proveniente de diferentes**

cruzamentos. 2007. 58f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal)-Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Alagoas, Rio Largo, 2007.

CASTRO, P.R.C. Controle da florescência da cana-de-açúcar. **Álcool & Açúcar**, São Paulo, v.4, n.17, p.44-49, 1984.

CHEAVEGATTI-GIANOTTO, A.; ABREU, H. M. C. de; ARRUDA, P.; BESPALHOK FILHO, J. C. ;BURNQUIST, W. L.; CRESTE, S.; DI CIERO, L.; FERRO, J. A.; FIGUERIRA, A. V. de O.; FILGUEIRA, T. de S.; GROSSI-DE-SÁ, M. de F.; GUZZO, E. C. ;HOFFMANN, H. P.; LANDELL, M. G. de A.; MACEDO, N.; MATSUOKA, S.; REINACH, F. de C.; ROMANO, E.; SILVA, W. J. da; SILVA FILHO, M. C.da; ULIAN, E. C. Sugarcane (*Saccharum X officinarum*): A reference study for the regulation of genetically modified cultivars in Brazil. **Tropical Plant Biology**, Hawaii, p. 62-89, 2011.

CLEMENTS, H.F. Lengthening versus shortening dark periods and blossoming in sugarcane as affected by temperature. **Plant Physiology**, Washington, v. 43, p. 57-60,1968.

CLEMENTS, H.F.; AWADA, M. Experiments on the artificial induction of flowering in sugarcane. **International Society Of Sugar Cane Technologists**, Quatre-Bornes, v.12, p.795-812, 1967.

CLEMENTS, H.F.; AWADA, M. Experiments on the artificial induction off lowering in sugarcane In: CONGRESS INTERNATIONAL SOCIETY OF SUGARCANE TECHNOLOGISTS - ISSCT, 12. 1965, Porto Rico. **Proceedings...** Porto Rico, 1965, p.554-560.

COLEMAN, E. R. Physiology of flowering in sugarcane. In: CONGRESS OF THE INTERNATIONAL SOCIETY OF SUGAR CANE TECHNOLOGISTS, 13., 1968, Taiwan. **Proceedings...** Amsterdam, Elsevier, 1969. p.992-1000.

CONAB, COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Indicadores da Agropecuária**. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/conabweb/>. Acesso em 06 de junho de 2011.

CRESTE, S.; TULMANN NETO, A. ; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining.

Plant Molecular Biology Reporter, Atenas, v.19, p.1-8. 2001

DANIELS, J.; ROACH, B.T. Taxonomy and evolution. In: HEINZ, D.J.. **Sugarcane improvement through Breeding**. Amsterdam: Elsevier, 1987, cap. 1, p.7-84.

FALCONER, D.S; MACKAY, T.F.C (Ed.). **Introduction to Quantitative Genetics**, 4th Ed. Longman, Harlow,1997, 464p.

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

GOMES, H. B. ;FERREIRA, R. A.; GOMES H.B; M. R. T. FILHO; M. R. T.; AMORIM, R. C. F.; CABRAL, S. L. **Associação Das Variações Meteorológicas Com O Florescimento Da Cana-De-Açúcar Em Alagoas – Um Estudo De Caso**.

Disponível em:
http://www.cbmet.com/edicoes.php?pageNum_Recordset_busca=2&totalRows_Recordset_busca=694&cgid=22. Acesso em 3 de junho de 2011.

GOSNELL, J.M. Some factors affecting flowering in sugarcane. **Proceeding of the South African Sugarcane Technologist Assosiation**, Mauritius, v.47, p.144–147, 1973.

HANNA, W.W.; L.E., TOWILL. Long-term pollen storage. **Plant Breeding Reviews**, Westport, v.13, p.179-207. 1995.

HEIDE, O.M. Effects of photoperiod and temperature on growth and flowering in Norwegian and British timothy cultivars (*Phleum pratense* L.). **Acta Agriculturae Scandinavica**, Copenhagen, v.32, p. 241-252,1982.

HEINZ, D.J.; TEW, T.L. Hybridization procedures. In: HEINZ, D.J. **Sugarcane improvement through breeding**. Amsterdam: Elsevier, 1987. p. 313-342.

HESLOP-HARRISON, J.; HESLOP-HARRISON, Y. Evaluation of pollen viability by enzymatically induced fluorescence; intracellular hydrolysis of fluorescein diacetate. **Stain Technology**, Baltimore, v.45, p.115-120, 1970.

HUMBERT, R.P. **El cultivo de la caña de azúcar**. Tradução de Alfonso Gonzalez Gallardo. México: Compañía Editorial Continental, 1974. 719p.

IMAZUMI, T.; TRAN, H. G.; SWARTZ, T. E.; BRIGGS, W. R. ;KAY, S. A. FKF1 is essential for photoperiodic-specific light signaling in Arabidopsis. **Nature**, v.426, p. 302–306, 2004.

KELLY, J. K.; RASCH, A.; KALISZ, S. A method to estimate pollen viability from pollen size variation. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 89, n. 6, p. 1021-1023, 2002.

KING, J.R. The peroxidase reaction as an indicator of pollen viability. **Stain technology**, Baltimore, v.35,p. 225-227, 1960.

KITTELSON, P. M; MARON, J. L. Outcrossing rate and inbreeding depression in the perennial yellow bush lupine, *Lupinus arboreus* (Fabaceae). **American Journal of Botany**, Columbus, v.87, 652-660, 2000.

LABORD, C.M. **Sugarcane tasseling under artificial photoperiod conditions as affected by nitrogen rate and temperature**. 2007. 76f. Tese (Doutorado em Fisiologia de Plantas). The School of Plant, Environmental, and Soil Sciences, Louisiana, 2007.

LANDELL, M. G. de A.; BRESSIANI, J. A.; Melhoramento Genético, Caracterização e Manejo Varietal. In: DINARDO-MIRANDA, L. L.; VASCONCELOS, A. C. M.; LANDELL, M. G. de A. **Cana-de-açúcar**. Campinas: Instituto Agrônômico. 2008, cap. 5, p.101 – 155.

LISCI, M.; TANDA, C.; PACINI, E. Pollination ecophysiology of *Mercurialis annua* L. (Euphorbiaceae) an anemophilous species flowering all year round. **Annals of Botany**, London, v. 74, p. 125-135.1994.

LIU, L. Sugarcane crossing technique. **Proceedings of International Society of Sugar Cane Technologists**, Mauritius, v.12, p.819-822, 1965.

LO, E. Y. Y., STEFANOVIĆ, Š.; DICKINSON, T. A. Population genetic structure of diploid sexual and polyploid apomictic hawthorns (*Crataegus*; Rosaceae) in the Pacific Northwest. **Molecular Ecology**, Oxford, v.18, p. 1145 –1160, 2009.

MACCOLL, D. Some aspects of the flowering of sugarcane in Barbados and its control in a breeding programme. **Annals of Botany**, London, v. 41, p. 191-201, 1977.

MACHADO JR, G.P. Melhoramento da cana-de-açúcar. In: PARANHOS, S.B. (Coord.). **Cana-de-açúcar: cultivo e utilização**. Campinas: Fundação Cargill, 1987, v.1, cap.2, p.165-186.

MANGELSDORF, A. J. **Um programa de melhoramento da cana-de-açúcar para a agroindústria canavieira do Brasil**. Rio de Janeiro: Instituto do Açúcar e do Alcool, 1966. 63 p.

MANIGBAS, N.L.; VILLEGAS, L.C. Microsatellite markers in hybridity tests to identify true hybrids of sugarcane. **Philippine Journal of Crop Science**, v.29, p. 23-32. 2004.

MANOHAR S. H. ; MURTHY H.N. Estimation of phenotypic divergence and powdery mildew resistance in a collection of *Cucumis sativus* L. **African Journal of Biotechnology**. Victoria Island, v. 10, n.11, p. 1978-1987. 2011.

MCINTYRE, C.L., JACKSON, P.A. Low level of selfing found in a sample of crosses in Australian sugarcane breeding programs. **Euphytica**, Wageningen, v.117, p.245–249, 2001.

MEAGHER, T.R. Analysis of paternity within a natural population of *Chamaelirium luteum* .1. Identification of most-likely male parents. **The American Naturalist**, Chicago, v.128, p.199–215, 1986.

MEAGHER, T.R.; THOMPSON, E. The relationship between single parent and parent pair genetic likelihoods in genealogy reconstruction. **Theoretical Population Biology** , New York, v.29, p.87–106, 1986.

MIDMOORE, D. J. effects of photoperiod on flowering and fertility of sugarcane (*Saccharum spp.*). **Field Crops Research**, Amsterdam, v.3, p. 65-81, 1980.

MOORE, P.H. Physiology and control of flowering. In: COPERSUCAR INTERNATIONAL SUGARCANE BREEDING WORKSHOP, 1987, Piracicaba. **Anais...**Piracicaba: Copersucar Technology Center, 1987, p.101-127.

MOORE, P.H., NUSS, K.J., 1987. Flowering and flower synchronization. In: HEINZ, D. J (Ed.), Sugarcane Improvement through Breeding. **Developments in Crop Science II**. 1987, p. 273–311.

MORGANTE, M.; OLIVIERI, A. M. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. **The Plant Journal**, East Lansing, v.3, n.1, p.175-182, 1993.

MORONI, R.; GASBARRA, D., ARJAS, E.; LUKKA , M.; ULMANEN I.Effects of Reference Population and Number of STR Markers on Positive Evidence in Paternity Testing. **Forensic Research**, Los Angeles, v.1, p. 654-655, 2008.

MULUVI, G.M.; SPRENT, J.I.; ODEE, D.; POWELL, W. Estimates of outcrossing rates in *Moringa oleifera* using Amplified fragment length polymorphism (AFLP). **African Journal of Biotechnology**, Victoria Island, v.3, p. 146-151, 2004.

NAYAMUTH R.; MANGAR, M.; SOOPAYA, R. Characterization of natural environments for sugar cane flowering ability. In: FOOD AND AGRICULTURAL RESEARCH COUNCIL, 6, 2003,**Proceedings...** Mauritius:Redit, 2003. p. 179-187.

NEPI, M.; FRANCHI, G.G. Cytochemistry of mature angiosperm pollen. **Plant Systematics and Evolution**, New York, v. 222, p. 45–62, 2000.

NEPI, M.; PACINI, E. Pollination, pollen viability and pistil receptivity in *Cucurbita pepo*. **Annals of Botany**, London, v. 72, p. 527-536. 1993.

NUSS, K.J. Synchronization of flowering to implement a proven cross breeding system in sugarcane. **Proceedings of the International Society of Sugarcane Technologists**, Mauritius, v.16, p.111-119,1978.

OLAOYE, G. Genetic variability between and within progenies of sugarcane crosses developed by modified polycross method at the seedling selection stage. **Ghana Journal of Agricultural Science**, v.34, p.101-107, 2001.

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.F.; SOUZA, A.P. Characterization of new polymorphic functional markers for sugarcane. **Genome**, Ottawa, v. 52, p. 191-209, 2009.

OLIVEIRA, J.F. **Viabilidade polínica e propagação em vitro de *Etilingera elatior* (Jack) R. M. Smith**. 2007. 73f . Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal). Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Alagoas, Rio Largo, 2007.

PAN, Y.B. , TEW , T. L. ; SCHNELL , R. J.; VIATOR , R. P. ; RICHARD JR., E. E.; GRISHAM, M. E.; WHITE, W. H. Microsatellite DNA Marker-assisted Selection of *Saccharum spontaneum* Cytoplasm-derived Germplasm. **Sugar Technology**, Amsterdam, v.4, p.23-29, 2006.

PAN, Y. O. Highly Polymorphic Microsatellite DNA Markers for Sugarcane Germplasm Evaluation and Variety Identity Testing. **Sugar Technology**, Amsterdam, v.8, p. 246-256, 2006.

PEDERSEN, J.F.; BEAN, S.R.; FUNNELL, D.L; GRAYBOSCH, R.A. Rapid iodine staining techniques for identifying the waxy phenotype in sorghum grain and waxy genotype in sorghum pollen. **Crop Science**, Madison, v.44, n.3, p. 764-767, 2004.

PEREIRA, A.R.. Previsão do florescimento em cana-de-açúcar. **Comunicação da Pesquisa Agropecuária**, São Paulo, v.3, n.6, p.15-16, 1985.

PINTO, L. R., K. M. OLIVEIRA, E. C. ULIAN, A. A. F. GARCIA AND A.P. SOUZA, Survey in the Sugarcane Expressed Sequence Tag database (SUCEST) for Simple Sequence repeats. **Genome**, Ottawa, v.47, p.795-804, 2004.

RADFORD, A.E, DICKISON, W.C, MASSEY, J.R., BELL, C.R. **Vascular Plant Systematics**. New York: Harper & Row Publishers, 1974. 891p.

RIDAY, H.; KROHN, A. L. Genetic map-based location of the red clover (*Trifolium pratense* L.) gametophytic self-incompatibility locus, **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.121, p. 761-767, 2010.

RODRIGUES, J.D. Fisiologia da cana-de-açúcar. Disponível em <<http://www.malavolta.com.br/pdf/1071.pdf>>. Acesso em 12 de agosto de 2011

RODRIGUEZ-RIANO, T.; DAFNI, A. A new procedure to assess pollen viability. **Sexual Plant Reproduction**, New York, v.12, p.241-244, 2000.

ROHLF, F. J. (1993). NTSYS-pc;. *Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, version 1.80*. Applied Biostatistics, Setauket, USA.

RYLE, G.A.; LANGER, R.M. Studies on the physiology of flowering of timothy (*Phleum pratense* L.) I. Influence of daylength and temperature on initiation and differentiation of the inflorescence. **Annals of Botany**, London, v.27, p. 213-229, 1963.

SAHLI, H. F.; CONNER, J. K.: Testing For Conflicting And Nonadditive Selection: Floral Adaptation To Multiple Pollinators Through Male And Female Fitness. **Evolution**, v.65, p.1457-1473, 2011.

SAI, E.A; JINKS-ROBERT, S.; PETES, T.D. Genetic control of microsatellite stability. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 383, p. 61-70, 1997.

SARTORIS, G. B. Longevity of sugar cane and corn pollen - a method for long distance shipment of sugar cane pollen by airplane. **American Journal of Botany**, Columbus, v.29,p. 395-403. 1942.

SAS INSTITUTE. SAS/STAT 9.2 user's guide. SAS Institute, Cary, NC, USA.

SCARPARI, M.S.; de BEAUCLAIR, E.G.F. Anatomia e Botânica. IN: DINARDO-MIRANDA, L.L.; DE VASCONCELOS, A.C.M.; LANDELL, M.G.A. . **Cana-de-açúcar**. 1. ed. Campinas: Instituto Agrônômico, 2008, cap. 2, p.47-56.

SCARPARI, M. S. ; GARCIA, J. C. ; XAVIER, M. A. ; LANDELL, M. G. A. ; MENDONCA, J. R. ; MELLONI, M.L.G. Building and automation of the first photoperiod facility made in Brazil for sugarcane breeding. In: 10Th GERMPLASM & BREEDING

7Th MOLECULAR BIOLOGY WORKSHOP, 2011, Maceió. **Proceedings...**: STAB, 2011. p. 39-39.

SILVA, M. A.; GONÇALVES, P. S. Inbreeding in sugarcane varieties. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.41, p.580-586, 2011.

SOENGAS, P.; PADILLA, G. ; FRANCISCO, M.; VELASCO, P. ; CARTEA, M. E. Molecular evidence of outcrossing rate variability in *Brassica napus*. **Euphytica**, Wageningen, v.180, p.301-306, 2011.

SRIVASTAVA, R.P.; SINGH, S.E.; SINGH, P.; SINGH, S.B. Artificial Induction of Flowering in Sugarcane Under Sub-tropical Conditions - A Successful Approach. **Sugarcane Research Institute**, Shahjahanpur, v.8, n. 2, 184-186, 2006.

STANLEY, R.G. & LINSKENS, H.F. **Pollen: biology, biochemistry and management**. Berlin: Springer-Verlag, 1974, 287p.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 4ª ed. Trad. Eliane Romanato Santarém et al. Porto Alegre: Artmed, 2009, 819 p.

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

UNICA, UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE- AÇÚCAR. **Produção de cana-de-açúcar no Brasil**. Disponível em <<http://www.unica.com.br/dadosCotacao/estatistica/>> . Acesso em 2 de junho de 2010.

VIŽINTIN, L.; BOHANEK, B. In vitro manipulation of cucumber (*cucumis sativus* L.) Pollen and microspores: isolation procedures, viability tests, germination, maturation. **Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica**, Krakol, v. 46, p.177–183, 2004.

WANG, Z.Y.; GE, Y.; SCOTT, M.; SPANGENBERG, G. Viability and longevity of pollen from transgenic and nontransgenic tall fescue (*Fescue arundinacea*) Poaceae plants. **American Journal of Botany**, St. Louis, v.91; p. 523-530, 2004.

ZANE, L.; BARGELLONI, L.; PATARNELLO, T. Strategies for microsatellite isolation: a review. **Molecular Ecology**, Oxford, v.11, n.1, p.1-16, 2002.

D
I
S
S.
/
M
E
L
L
O
N
I

M.
L.
G.

2
0
1
2