

PAULO MAFRA DE ALMEIDA COSTA

**USO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES NA CONFIRMAÇÃO DE
AUTOFECUNDAÇÃO EM CANA-DE-AÇÚCAR**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2011

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

C837u
2011

Costa, Paulo Mafra de Almeida, 1985-

Uso de marcadores microssatélites na confirmação de autofecundação em cana-de-açúcar / Paulo Mafra de Almeida Costa. – Viçosa, MG, 2011.

vii, 34f. : il. ; 29cm.

Orientador: Márcio Henrique Pereira Barbosa.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 31-34

1. Endogamia. 2. Marcadores genéticos. 3. *Saccharum spp.*
4 Cana-de-açúcar - Melhoramento genético. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

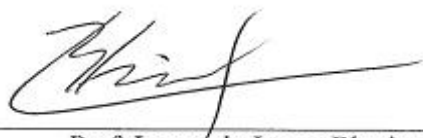
CDD 22. ed. 576.544

PAULO MAFRA DE ALMEIDA COSTA

**USO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES NA CONFIRMAÇÃO DE
AUTOFECUNDAÇÃO EM CANA-DE-AÇÚCAR**

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


APROVADA: 26 de julho de 2011.



Prof. Leonardo Lopes Bhering
(Coorientador)



Pesquisador Felipe Lopes da Silva



Prof. Márcio Henrique Pereira Barbosa
(Orientador)

Dedico

Aos meus pais, Eliana e Flávio,

Ao meu irmão Flávio,

À minha família e amigos,

em especial à minha Vó Ilka, que partiu deixando saudades.

*"Valeu a pena? Tudo vale a pena
Se a alma não é pequena.
Quem quer passar além do Bojador
Tem que passar além da dor.
Deus ao mar o perigo e o abismo deu,
Mas nele é que espelhou o céu."*

Fernando Pessoa

AGRADECIMENTOS

A Deus por me iluminar na luta pelos meus sonhos com saúde e perseverança.

À minha primeira e eterna professora, pelos sacrifícios, ensinamentos, exemplo de mulher. Por me educar com muito amor e sabedoria. Mãe, obrigado por tudo. Te amo!

Ao homem em quem me espelho e por quem tento sempre fazer o melhor. Meu pai, obrigado pelos sacrifícios para que eu possa realizar meus sonhos e por ser um exemplo de vida para mim. Te amo!

Ao meu irmão e grande companheiro Flávio, pelo exemplo de perseverança e espírito empreendedor, sempre torcendo por mim.

À Sol, pelo amor, doçura, companheirismo e carinho incondicional.

Aos meus tios e tias, primos e primas, em especial ao meu tio Geraldo e ao primo Marco Antônio, pelos ensinamentos e por me motivarem a lutar por um país agrícola mais justo e próspero.

À memória dos meus queridos avós Wilson e Ilka; Sylvio e Maria, pelos ensinamentos e carinho constantes.

A todos meus familiares por sempre torcerem pelo meu sucesso.

A todos os amigos que contribuíram em minha formação, dividindo momentos de alegria e também de dificuldades, em especial à turma da Chapa24, Agro/04 e aos companheiros da República Calango e BTL.

Ao Leandro e Mayra pela amizade e pela convivência divertida compartilhada.

Aos mestres que passaram por toda minha vida estudantil, sejam eles bons ou não, mas que na arte de ensinar transmitem sempre alguma qualidade a ser enfatizada ou um erro a ser corrigido.

Ao Prof. Márcio Henrique Pereira Barbosa, pelos ensinamentos, apoio, incentivo, confiança e paciência nesses anos todos de orientação na minha vida acadêmica. Obrigado por apoiar minha caminhada em busca do conhecimento científico.

A todos os professores e funcionários da UFV, em especial ao Prof. Sérgio Yoshimitsu Motoike, pelo incentivo e apoio no laboratório; ao Prof. José Marcelo Soriano Viana por acreditar no potencial do Laboratório de Biotecnologia e Melhoramento Vegetal (LBMV); ao Prof. Leonardo Lopes Bhering pela coorientação e ensinamentos e ao Eng^o Agr^o Francisco de Assis pelo apoio no LBMV.

Aos pesquisadores Dr. Felipe Lopes da Silva (Epamig), Dra. Cássia Ângela Pedrozo (Embrapa), Dr. Valdir Diola (UFRRJ) e Dra. Cândida Elisa Manfio pelo apoio

constante e ensinamentos humildemente transmitidos desde a minha graduação, muito contribuindo para meu aprendizado científico.

Ao Programa de Melhoramento Genético de Cana-de-Açúcar/RIDESA pelo apoio, em especial à equipe do CECA, Luís Cláudio, Vicente, Boião, Marquinhos, Daniel, Tônico, Geraldo, Zezé, Tião, Jairo, Zé Russo e muitos outros que contribuíram para a execução dos trabalhos.

Aos amigos da equipe Cana pelo incentivo e companheirismo. Ao Thiago Otávio, Gustavo, David, Alejandro e Volmir pela amizade e ajuda na operacionalização dos trabalhos.

Aos companheiros do LMBV, Cleverson, Éder Lanes, Ciro, Geísa, Filipe e João pelo apoio e convivência divertida no laboratório, tornando o ambiente agradável. Ao amigo Éder Lanes gostaria de agradecer pelo incentivo e humildade em transmitir sua experiência na execução dos trabalhos.

Aos amigos da Genética e Melhoramento pelo convívio e motivação; ao Carlos Henrique pelo apoio e ensinamentos.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento pela oportunidade de realizar meus estudos.

À Capes, pela concessão da bolsa de estudos e por fomentar a capacitação dos estudantes brasileiros.

Gostaria de agradecer a todos que contribuíram para a realização deste trabalho, direta ou indiretamente, bem como a todos que torcem pelo meu sucesso em busca dos meus sonhos. Obrigado!

ÍNDICE

RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
Introdução Geral.....	1
Material e Métodos	8
Resultados	16
Discussão	20
Conclusões	30
Referências.....	31

RESUMO

COSTA, Paulo Mafra de Almeida, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2011. **Uso de marcadores microssatélites na confirmação de autofecundação em cana-de-açúcar.** Orientador: Márcio Henrique Pereira Barbosa. Coorientadores: Sérgio Yoshimitsu Motoike e Leonardo Lopes Bhering.

Indivíduos endógamos superiores selecionados em famílias S_1 podem integrar um programa de seleção recorrente recíproca em cana-de-açúcar, eliminando a carga genética da população e explorando combinações híbridas superiores. A identificação confiável dos indivíduos verdadeiramente provenientes de autofecundação nas populações S_1 pode ser realizada por meio de marcadores moleculares. O objetivo desse estudo foi empregar marcadores microssatélites na confirmação de progênies resultantes de autofecundação em cana-de-açúcar. Oito locos selecionados produziram 62 alelos em oito cultivares testadas, com número de alelos por marcador variando de 6 a 15 e média de 7 alelos por loco. Três locos foram altamente informativos e utilizados no acesso dos níveis de autofecundação em cinco famílias S_1 . As proporções de autofecundação encontradas variaram de 20 a 58,1%, embora acredita-se que haja uma subestimação dos valores, devido ao número de amostras eliminadas da análise final. Os locos microssatélites possibilitam uma identificação confiável de indivíduos S_1 em cruzamentos de cana-de-açúcar e podem ser empregados em estratégias de seleção em um programa de melhoramento de cana-de-açúcar.

ABSTRACT

COSTA, Paulo Mafra de Almeida, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, July 2011. **Microsatellites DNA markers for the confirmation of selfing in sugarcane.** Adviser: Márcio Henrique Pereira Barbosa. Co-advisers: Sérgio Yoshimitsu Motoike and Leonardo Lopes Bhering.

Superior inbred clones selected in S_1 families can integrate a reciprocal recurrent selection program of sugarcane by eliminating the genetic load of the population and exploring superior hybrid combinations. Molecular markers can be used for reliable identification of true selfing-derived clones in S_1 populations. The objective of this study was to confirm true selfs in sugarcane families using microsatellite markers. The eight SSR primers chosen generated a total of 62 polymorphic markers, with the number of alleles recorded per SSR marker across the 8 cultivars tested ranged between 6 and 15 with an average of 7. Three loci were found to reveal highly informative bands and were used to assess the level of selfing in five S_1 families. Levels ranged from 20 to 58,1 % which would be as a result of subestimated values due to a limited number of samples in the final analysis. The SSR loci provide a reliable and accurate identification of S_1 progenies in sugarcane crossings and can be used as a tool to assist selection strategies in sugarcane breeding programs.

INTRODUÇÃO GERAL

A cana-de-açúcar consolidou-se como matéria-prima de destaque no agronegócio brasileiro. O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, de açúcar e o segundo maior produtor de etanol. Atualmente, a cana e seus derivados são a segunda principal fonte de energia primária da matriz energética nacional - cerca de 18% da energia consumida no país provém de derivados da cana-de-açúcar – e o setor gerou US\$ 28 bilhões de PIB e 1,28 milhões de postos de trabalho formais em 2010 (UNICA, 2011a). A área de cana-de-açúcar cultivada na safra 2011/2012 está estimada em 8,442 milhões de hectares, com previsão de 641,982 milhões de toneladas de cana moída, sendo 48,11% e 51,88% do total destinados à produção de açúcar e etanol, respectivamente (BRASIL, 2011).

Dentre os fatores que impulsionaram o setor sucroalcooleiro nas últimas décadas o desenvolvimento de cultivares através do melhoramento genético assume reconhecidamente um papel de destaque. Nos últimos 35 anos, a produtividade da cultura aumentou em mais de 30 ton.ha⁻¹ (incremento de 66%) e de açúcar produzido por tonelada de cana em 2% anuais (incremento de 135%) (Barbosa e Silveira, 2010; UNICA, 2011b). A cultivar é a tecnologia de maior importância para aumento da produtividade de cana-de-açúcar e melhoria na qualidade da matéria prima.

Do ponto de vista botânico, a cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) é uma planta semi-perene pertencente à família *Poaceae* e gênero *Saccharum*. As cultivares comerciais são híbridos complexos interespecíficos, aneuplóides (o número total de cromossomos não é múltiplo do número base de cromossomos) e poliplóides (mais de dois cromossomos dentro de uma mesma classe de homologia) com $2n=8x-10x=100-130$ cromossomos, dependendo da espécie e/ou variedade. São oriundos de cruzamentos entre duas das seis espécies conhecidas: *S. officinarum* ($2n=8x=80$)

contribuindo com o alto teor de açúcar e *S. spontaneum* ($2n=5x$ a $16x=40$ a 128), responsável pelo vigor vegetativo e resistência aos estresses bióticos e abióticos, seguidos de retrocruzamentos usando *S. officinarum* como parental recorrente (D'Hont et al., 1998; Piperidis et al., 2010).

Dentre os métodos de hibridação da cana-de-açúcar os mais usados são o policruzamento, que consiste em reunir grande número de genitores para que eles se inter cruzem; e o cruzamento simples (biparentais), em que os genitores masculinos e femininos são conhecidos (Heinz and Tew, 1987). As inflorescências da cana-de-açúcar (panículas) são compostas por flores completas, as quais apresentam diferentes níveis de viabilidade polínica. Os genitores são classificados como macho, fêmea ou intermediário de maneira subjetiva com base na viabilidade polínica determinada por métodos de coloração dos grãos de pólen e as classes sexuais variam de acordo com taxas determinadas pelos programas de melhoramento (McIntyre e Jackson 2001).

No Brasil, emprega-se a coloração com lugol e a determinação do sexo é feita visualmente. Geralmente, os clones que participam dos cruzamentos como genitor feminino podem ser emasculados por meio de tratamento com água na temperatura de $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 4,5 minutos. Contudo, o tratamento não garante total emasculação do genitor feminino, além de prejudicar a viabilidade das sementes resultantes do cruzamento (Manigbas e Villegas, 2004; Machado et al. 1996). Sendo assim, em cruzamentos de cana-de-açúcar envolvendo parental feminino que produz pólen viável é possível a ocorrência de autofecundação. Hogarth (1980) estudou o efeito da autofecundação acidental em um dialelo completo com cinco genitores por meio da avaliação visual do vigor das plantas, determinando taxas de 0 a 80% de autofecundação variando de acordo com os genitores empregados e a direção do

cruzamento. McIntyre e Jackson (2001) encontraram taxas variando de 0 a 17,6% em oito cruzamentos através de análise molecular com marcadores RAPD. Tew e Pan (2010) avaliaram sete policruzamentos e determinaram taxas de 0 a 45% de autofecundação por meio de análise de marcadores microsatélites.

A depressão por endogamia causada pela autofecundação em cana-de-açúcar afeta de maneira geral a fertilidade do pólen, germinação de sementes e componentes de produção (Ferreira et al., 2005; Silva e Gonçalves, 2011). Stevenson (1965) apresenta uma revisão de trabalhos pioneiros no desenvolvimento de linhagens endogâmicas em cana-de-açúcar em Barbados e nos Estados Unidos, relatando que existe uma variância interespecífica quanto à perda de vigor decorrente da endogamia. Variedades geneticamente próximas à espécie *S. spontaneum* apresentam menor depressão no vigor do que variedades relacionadas à *S. officinarum*. Em certos casos, populações resultantes de autofecundação de híbridos interespecíficos não apresentam perda de vigor, comportando-se como espécies selvagens (*S. spontaneum*) aparentadas. Além disso, a endogamia afeta os vários componentes de produção de maneira diferenciada.

Ethirajan et al. (1978) avaliaram progênies S_1 , S_2 e S_3 de seis variedades na Índia e encontraram segregantes significativamente superiores aos genitores quanto à produtividade e teor de açúcar, indicando a viabilidade do emprego de clones endogâmicos como fonte de alelos favoráveis para o melhoramento dos caracteres estudados, pois a endogamia contribui para a eliminação de alelos indesejáveis e fixação de alelos desejáveis. Cassalett et al. (1996) estudaram a autofecundação em 29 variedades na Colômbia. Os caracteres teor de açúcar e resistência a doenças apresentaram ampla segregação na progênie, indicando a utilidade deste sistema de cruzamento no melhoramento. Adicionalmente, caracteres favoráveis eventualmente

mascarados pela condição de ploidia em determinados genótipos podem se expressar em função da autofecundação, assim como os alelos que não se expressam devido à dominância (Ferreira et al., 2005).

A depressão por endogamia não é significativa para alguns caracteres como brix (teor de sólidos solúveis) e tonelada de colmos por hectare (TCH). Por outro lado, indivíduos endogâmicos tendem a apresentar baixa germinação de sementes, menor altura, peso e diâmetro de colmos em comparação com indivíduos resultantes de fecundação cruzada (Hogarth, 1980; Machado et al., 1996; Ferreira et al., 2005; Silva e Gonçalves, 2011). A depressão tende a ser maior em relação a caracteres onde a proporção de locos em heterozigose é maior. No entanto, é possível selecionar indivíduos endogâmicos promissores para todos os caracteres agrônômicos estudados em cana-de-açúcar, principalmente brix e número de colmos, pois há também efeito dos genitores envolvidos nos cruzamentos na magnitude da depressão. Clones que possuem alta frequência de alelos favoráveis tendem a derivar clones endogâmicos com melhor desempenho e estes podem ser empregados como genitores no processo de seleção recorrente recíproca ou para produzir vigor híbrido em cruzamentos (Ferreira et al., 2005; Silva e Gonçalves, 2011).

Neste contexto, a seleção recorrente recíproca individual (SRRI), empregada no melhoramento de caracteres que apresentam considerável heterose, torna-se estratégia útil para a cultura da cana-de-açúcar. A SRRI, conforme proposto por Resende e Barbosa (2005), envolve apenas um indivíduo de cada população, os quais devem resultar em cruzamento com alto valor genotípico total e também alta capacidade específica de combinação (CEC). Esses indivíduos que originam o cruzamento superior são autofecundados, produzindo duas populações endogâmicas (S_1), nas quais são selecionados indivíduos superiores para integrar um programa de

seleção recorrente recíproca. A SRRI usando S_1 é indicada para o melhoramento da cana-de-açúcar, pois visa explorar o máximo da CEC a partir da identificação prévia da melhor combinação híbrida por meio dos experimentos de avaliação de famílias. O emprego de indivíduos endógamos selecionados em famílias S_1 visa eliminar a carga genética da população e explorar por mais um ciclo a combinação híbrida superior identificada previamente (Barbosa e Silveira, 2010).

Para que o procedimento da SRRI seja realizado com eficiência, torna-se necessário o emprego de métodos mais apurados na identificação dos indivíduos verdadeiramente provenientes de autofecundação nas populações S_1 , uma vez que tal objetivo não é alcançado pela simples avaliação fenotípica nas populações.

A confirmação de autofecundação em populações S_1 pode ser realizada por meio de marcadores moleculares em estágios iniciais de desenvolvimento das progênes. Dentre os marcadores atualmente utilizados, os microssatélites são indicados para este tipo de análise. Um marcador molecular é uma região do genoma (loco) de um dado organismo que apresenta variabilidade na sua composição de bases do DNA. Essa variabilidade, ou polimorfismo, gera uma diversidade de marcas que podem ser visualizadas e utilizadas para distinguir indivíduos da mesma espécie (Matsuoka, Garcia e Calheiros, 2009).

Os marcadores microssatélites ou SSR (do inglês *Simple Sequence Repeats*) são sequências simples de nucleotídeos (em número de 1 a 6) repetidos em tandem (em linha). As sequências de DNA que flanqueiam os microssatélites são conservadas entre indivíduos de uma mesma espécie, permitindo seleção de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) específicos que amplificam fragmentos contendo DNA repetitivo em todos os genótipos pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (Borém e Caixeta, 2009). Cada microssatélite constitui um loco

genético multialélico, isto é, diferentes fragmentos são amplificados pelo mesmo iniciador e correspondem a diferentes formas alélicas deste loco no genoma. Além disso, são altamente variáveis entre os indivíduos, possuindo grande conteúdo informativo. Os microssatélites apresentam grande valor no estudo de muitas espécies de plantas atribuído à sua natureza multialélica, herança codominante, facilidade de detecção pela PCR, abundância relativa e cobertura extensiva do genoma (Oliveira et al., 2006). O elevado custo para desenvolvimento de microssatélites constitui o maior entrave para seu emprego em análises moleculares. Porém, uma vez desenvolvidos, podem ser reproduzidos por diferentes laboratórios. Os microssatélites atendem aos principais requisitos necessários para utilização na identificação de cultivar: 1) máxima variação entre cultivares, 2) mínima variação dentro de um cultivar, 3) estabilidade ambiental e 4) reprodutibilidade experimental (Weising et al., 2005).

Estudos apontaram a viabilidade dos marcadores SSR para genotipagem molecular de cultivares e avaliação da variabilidade genética de cana-de-açúcar, indicando dezenas de marcadores polimórficos e úteis em estudos moleculares (Cordeiro et al., 2000; Cordeiro et al., 2003; Pan et al. 2003; Pan, 2006). Maccheroni et al. (2009) desenvolveram um sistema de impressão digital genética (*fingerprinting*) baseado em marcadores microssatélites, cujo emprego de três locos foi capaz de diferenciar 1.205 genótipos de cana-de-açúcar. Tew e Pan (2010) utilizaram sete marcadores microssatélites altamente polimórficos para análise de paternidade em sete policruzamentos de cana-de-açúcar. Por meio destes marcadores foram gerados 51 alelos polimórficos, os quais permitiram a identificação de paternidade de 79 a 99% das progênes obtidas.

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi empregar análise molecular de locos microssatélites para a confirmação de indivíduos S1 provenientes de autofecundações de variedades de cana-de-açúcar, com vistas à utilização destes indivíduos endogâmicos em um esquema de seleção recorrente recíproca individual.

MATERIAL E MÉTODOS

Material Vegetal

As autofecundações (*selfing*) foram realizadas na Estação de Cruzamentos da Serra do Ouro, Murici/AL, de acordo com os procedimentos rotineiros do Programa de Melhoramento Genético da Cana-de-Açúcar da Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroalcooleiro (PMGCA/RIDESA). As panículas foram isoladas por meio de campânulas com objetivo de evitar a contaminação por pólen de outras cultivares. As sementes foram enviadas para o Centro de Pesquisa e Melhoramento da Cana-de-Açúcar – CECA/ Oratórios – MG e germinadas também de acordo com os procedimentos de rotina do PMGCA. Foram avaliadas cinco famílias, as quais são indivíduos S_1 (*selfs*) putativos resultantes da autofecundação das cinco cultivares: 1) RB867515; 2) RB928064; 3) RB865230; 4) RB855536; 5) RB855156. Cada cruzamento gerou 168 plântulas, as quais foram cultivadas em campo em sete blocos compostos por parcelas de dois sulcos com 24 plantas. De cada cruzamento foram amostradas 55 plantas para extração de DNA, à exceção da família S_1 da cultivar RB855156, em que a amostra foi constituída por 30 indivíduos.

As amostras de tecidos foliares foram coletadas de plantas adultas (12-16 meses) por meio da retirada de lâmina foliar de aproximadamente 8 cm² das folhas mais tenras situadas na ponteira (cartucho) da planta. Em seguida, foram acondicionadas em microtubo de 1,5 mL do tipo eppendorf, mergulhadas em nitrogênio líquido e transportadas até o laboratório em botijão criogênico. As amostras não utilizadas imediatamente permaneceram armazenadas a -75 °C em ultrafreezer.

Extração de DNA e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

As análises moleculares foram realizadas no Laboratório de Biotecnologia e Melhoramento Vegetal/DFT da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa/MG. Para extração de DNA genômico dos indivíduos das famílias 1 e 2 empregou-se protocolo do CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio) descrito por Doyle e Doyle (1990) com modificações (Lanes et al., 2009). Aproximadamente 200 mg de tecido foliar foram macerados em nitrogênio líquido em cadinhos de porcelana e transferidos para tubos de microcentrífuga de 1,5 mL, adicionando-se 800 µL de tampão de extração pré-aquecido a 65 °C (NaCl 1,4 M; Tris-HCl 110 mM, pH 8,0; EDTA 55 mM; CTAB 2,8%) e 80 µL de SDS 20% (dodecil sulfato de sódio). Incubaram-se as amostras a 65°C por 60 minutos, invertendo os tubos suavemente a cada 10 minutos. Após a incubação, as amostras foram deixadas a temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida, adicionaram-se às amostras 450 µL de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1 v/v) para a desproteínização. Os tubos foram invertidos, cuidadosamente, por 10 minutos e depois centrifugados a 13.000 rpm para separação das fases. O sobrenadante (aproximadamente 650 µL) de cada amostra foi transferido para novo tubo de 1,5 mL e repetiu-se o procedimento de desproteínização. Após nova centrifugação (8 minutos, 13.000 rpm), o sobrenadante de cada amostra foi transferido para tubos de 1,5 mL para a precipitação do DNA, adicionando-se 700 µL de isopropanol gelado (mantido a -20 °C). Os tubos foram mantidos a -20 °C por 2 horas e em seguida centrifugados a 13.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado duas vezes com 300 µL etanol 70% (v/v) e seco em temperatura ambiente por aproximadamente 60 minutos. As amostras foram incubadas a 65 °C por 10 minutos em 70 µL de TE 0,1X com RNase (1 mM Tris-

HCl pH 8; 5 mM EDTA, RNase 40 ng.µL⁻¹) para digestão do RNA contaminante e ressuspensão do DNA. O DNA isolado foi armazenado a -20 °C até sua utilização.

O DNA genômico dos indivíduos das famílias 3, 4 e 5 foi extraído por meio do kit comercial DNeasy Plant Mini Kit da Qiagen® de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante.

A quantificação do DNA extraído foi determinada pelo valor da absorbância de 260 nm medida em espectrofotômetro (Shimadzu®, Japão). A integridade das moléculas de DNA foi avaliada por eletroforese (90 V) em gel de agarose 0,8% (p/v) utilizando solução tampão TAE 1x (Tris-base 0,04 M; ácido acético glacial 0,114%; EDTA 1 mM, pH 8,0) corado com brometo de etídio e visualizado e fotografado em ultravioleta utilizando fotodocumentador L-PIX ST (Loccus Biotecnologia, Brasil). Para obter o “DNA de trabalho” as amostras tiveram suas concentrações padronizadas em 12 ng.µL⁻¹, através de diluições em tampão TE.

As sequências (*Forward* e *Reverse*) dos oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) de microssatélites foram obtidas de Pan (2006) e Maccheroni et al. (2009) e pré-selecionados de acordo com o conteúdo informativo de polimorfismo. Um total de 24 primers foram pré-selecionados e testados na genotipagem de oito cultivares comerciais de cana-de-açúcar para escolha dos melhores primers: 1) RB867515, 2) RB928064, 3) RB865230, 4) RB855536, 5) RB855156, 6) RB739359, 7) SP80-1816 e 8) RB925345.

As reações de PCR foram conduzidas em placas de 96 poços (PCR-96-MB-C - 0,2 mL – Axygen Scientific) em um volume de 20 µL contendo: 48 ng de DNA genômico, 4 µL de 5x Colorless GoTaq® Flexi Buffer (Promega®), 2 µL de MgCl₂ a 25mM (Promega®), 0,8 µL de dNTPs mix a 10mM (Promega®, USA, cat. N° U1515), 2 µL de cada primer (*Forward* e *Reverse*) a 2 µM, 1 unidade de GoTaq®

Flexi DNA Polimerase (Promega®, USA, cat. N° M8295) e água Milli-Q autoclavada para completar volume final de 20 µL. As condições do programa de PCR foram ajustadas com modificações na temperatura de anelamento baseadas na *melting temperature* (T_m) fornecida pelo fabricante dos oligonucleotídeos. O menor valor de T_m de cada par de primer foi testado com variação de mais ou menos 2 °C em relação à menor T_m, as exceção dos *primers* desenvolvidos por Maccheroni et al. (2009), testados de acordo com a temperatura publicada. Os ciclos foram realizados em termociclador Veriti® 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, modelo n° 9902) nas seguintes condições: uma desnaturação inicial a 94 °C por 5 minutos, 37 ciclos compostos por uma desnaturação a 94 °C por 40 segundos, anelamento à temperatura de cada par de primers por 40 segundos e extensão a 72 °C por 40 segundos. Por fim, realizou-se uma extensão final de 72 °C por 2 minutos. Aos produtos da reação de PCR foram adicionados 8,0 µL de tampão de corrida (*loading buffer*) composto por (formamida 98%; EDTA 10 mM, pH 8,0; *xylene cyanol* 1 mg/mL e *bromophenol blue* 1 mg/mL) e em seguida desnaturados a 95 °C por 5 minutos em termociclador.

Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (PAGE)

Os produtos de amplificação de SSR foram separados em gel de poliacrilamida 6,0% (acrilamida/bis-acrilamida 19:1, Bio-Rad® cat. N° 161-0144; 7,5M de uréia; TBE 5,0X), utilizando-se o sistema eletroforético “Sequi-Gen GT” (Bio-Rad® cat. N° 165-3862) em solução tampão TBE 1X (Tris-base 0,09 M; ácido bórico 0,09 M e 2 mM EDTA, pH 8,0). As placas usadas na montagem do gel foram cuidadosamente limpas, empregando etanol 70% (procedimento repetido por três

vezes). Na placa maior, onde o gel deve ser aderido, foi aplicado 1,1 mL de solução contendo 95% de etanol absoluto, 0,5% de ácido acético e 2,2 µL de PlusOne Bind-silane® (Amersham Biosciences cat. N°17-1330-01). Esta solução foi aplicada na superfície da placa e deixada secar por 10 minutos, após este tempo, o excesso foi retirado com etanol absoluto 70%. A placa menor foi cuidadosamente limpa utilizando o mesmo procedimento anterior descrito, contudo, nesta foi aplicado Sigmacote® (Sigma, cat. N° SL2), substância hidrofóbica que tem como objetivo evitar que o gel venha a se aderir nesta placa na etapa de desmontagem, logo após a eletroforese. Após dez minutos de secagem, o excesso foi retirado com etanol absoluto 70%.

No preparo do gel foram empregados 70 mL da solução estoque de bis-acrilamida 6%, adicionando no momento do preparo do gel 40 µL de TEMED® (N,N,N',N'-Tetrametiletilenodiamino, Sigma, cat. N° T9281) e 250 µL de persulfato de amônio 10% e deixando polimerizar por duas horas. Anterior à aplicação das amostras, procedeu-se uma pré-corrída de 45 minutos a 90 W, com corrente limitada a 1750 V e 80 mA em fonte de eletroforese (Bio-rad® PowerPac™ HV Power Supply modelo n° 164-5056). Antes e após a pré-corrída a canaleta foi limpa com o auxílio de uma seringa, onde posteriormente, ajustou-se o pente de 49 canaletas (Bio-Rad®, cat. N° 165-3812) para direcionar a aplicação das amostras. A eletroforese foi conduzida sob voltagem constante de 60 Watts, 1750 V e 60 mA e temperatura de 50 °C por aproximadamente 2 horas, de acordo com o tamanho do fragmento amplificado.

Para a coloração do gel, empregou-se o método de coloração com nitrato de prata (Brito et al., 2010) modificado. Após a eletroforese, a placa contendo o gel foi imersa em solução fixadora (etanol absoluto 1% e ácido acético 1%, mantido sob

agitação lenta por 10 minutos. Em seguida, o gel foi lavado com 2L de água destilada sob agitação por 1 minuto. O pré-tratamento foi realizado pela imersão do gel em solução contendo ácido nítrico 1% por 3 minutos. Efetuou-se mais uma lavagem utilizando 2L de água destilada por 1 minuto, sob agitação. O gel foi corado com solução de nitrato de prata (AgNO_3 0,2%) por 20 minutos, e em seguida efetuaram-se duas lavagens de 30 segundos cada com água destilada, sob agitação. Posteriormente, aplicou-se 800 mL de solução reveladora composta por carbonato de sódio (Na_2CO_3 2,5%) e formaldeído (0,01%) e o gel foi mantido sob agitação até que as primeiras bandas pudessem ser visualizadas. Esta solução foi descartada e adicionada ao processo o restante da solução reveladora (1200 mL). O gel foi corado até apresentar padrão de coloração aceitável para avaliação dos fragmentos. Finalmente, efetuou-se a imersão do gel em 2L de solução bloqueadora (ácido acético) por 5 minutos, sob lenta agitação, seguido de lavagem em 2L de água destilada por 1 minuto. O gel corado foi mantido em local arejado para a secagem e posterior análise dos fragmentos de DNA amplificados e fotodocumentação em *scanner* HP scanjet G4050.

Análise do polimorfismo

Em cana-de-açúcar, a análise e interpretação do padrão eletroforético gerado por um marcador microssatélite é feita pela ausência ou presença de bandas individuais, as quais são consideradas como marcas dominantes. Os alelos foram identificados por inspeção visual e o tamanho dos fragmentos estimado por comparação com o padrão de peso molecular de 25 pares de bases (Promega®). As várias bandas amplificadas são representadas por seus tamanhos em pares de base,

atribuindo-se a cada genótipo analisado a presença ou ausência daquele fragmento (Figura 1). Tais marcas são lidas nos perfis dos indivíduos da progênie e comparadas aos parentais. A presença de alelos (fragmentos) na progênie que não estejam presentes no genitor é indicativa de contaminação por pólen estranho ou mistura de sementes, classificando o indivíduo como contaminante (Tew e Pan, 2010). Um loco microssatélite é interpretado como marcador em dose simples (MDS). Sua segregação equivale a um alelo simples ou no estado de heterozigoto nos gametas: metade dos gametas contém o DNA de um fragmento e a outra metade não. Estes tipos de gametas podem ser visualizados na progênie de um determinado cruzamento, onde tal fragmento está presente em um parental e ausente no outro (Wu et al., 1992; Oliveira, 2006).

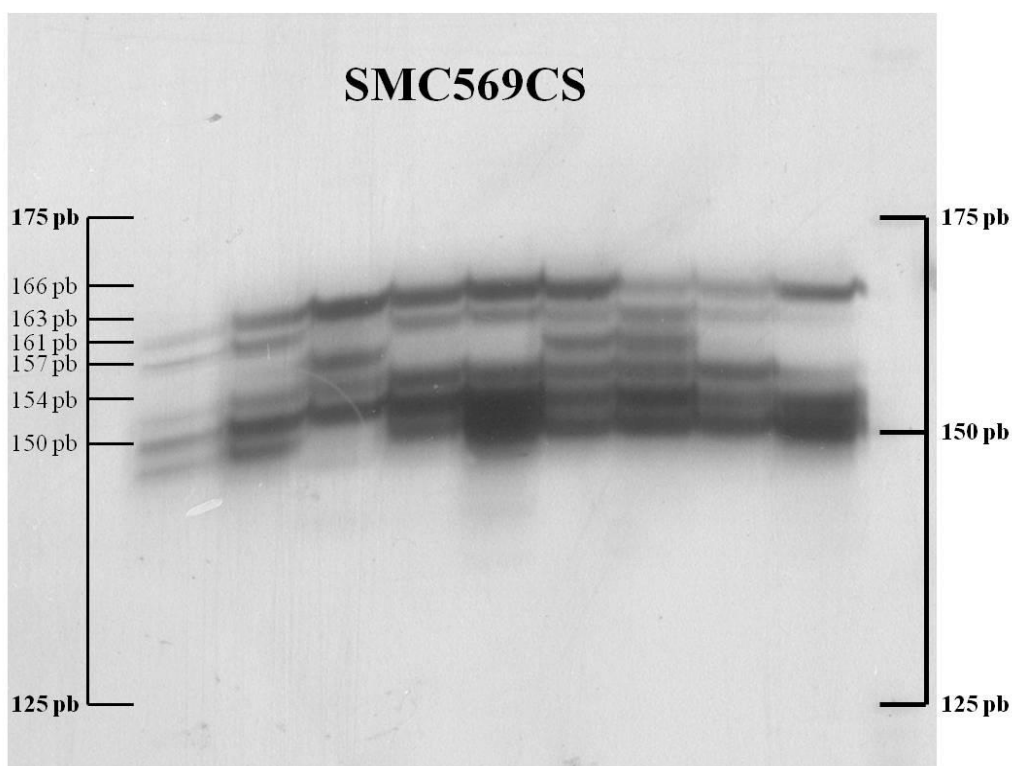


Figura 1 - Imagem de gel de poliacrilamida 6%, corado com nitrato de prata, contendo produtos de amplificação do loco microssatélite SMC569CS de oito cultivares de cana-de-açúcar. Cada banda é tratada como uma marca individual, ou seja, o loco em questão gerou 6 alelos com tamanhos de 166, 163, 161, 157, 154 e 150 pares de base. M: marcador de peso molecular 25 bp (Promega®).

RESULTADOS

Seleção de marcadores SSR

Do total de primers pré-selecionados, oito foram selecionados por apresentarem amplificação satisfatória pela PCR e facilidade de avaliação das bandas (Tabela 1). Os demais apresentaram amplificações inespecíficas, fracas ou difusas, além de alelos falsos (bandas *stutter* – resultantes do escorregamento da Taq DNA polimerase durante a amplificação dos microsatélites), dificultando a leitura dos alelos verdadeiros (Figura 2).

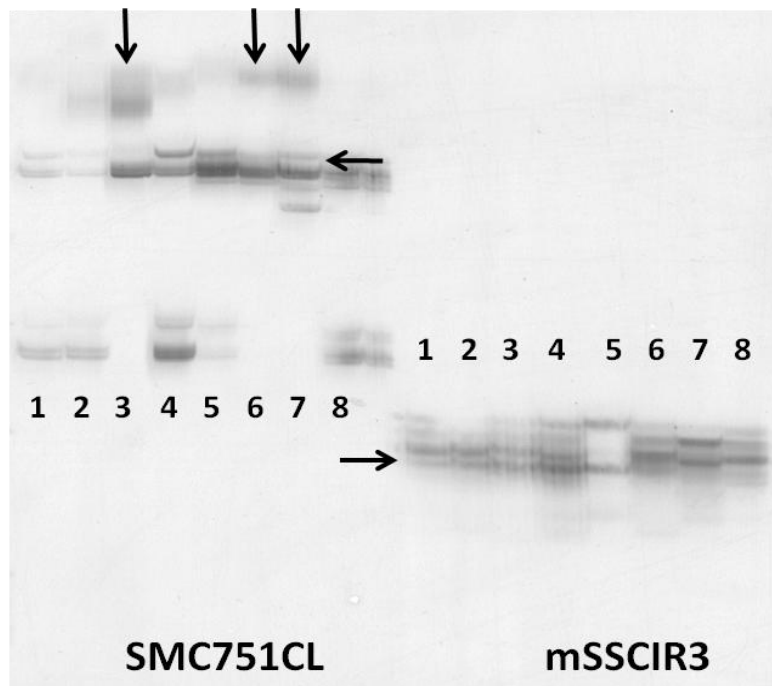


Figura 2 - Imagem de gel de poliacrilamida 6% corado com nitrato de prata contendo produtos de amplificação dos locos microsatélites SMC751CL e mSSCIR3 em oito genótipos de cana-de-açúcar. Setas horízontais representam alelos falsos denominados *stutter* e setas verticais representam bandas difusas.

Tabela 1 – Marcadores microssatélites selecionados em cana-de-açúcar: nome, unidade repetitiva, tamanho do amplicon e sequências.

SSR	Unidade de repetição	Amplicon esperado (bp)	Sequência Forward (5' – 3')	Sequência Reverse (5' – 3')
SMC24DUQ¹	(TG) ₁₃	125-149	CGC AAC GAC ATA TAC ACT TCG G	CGA CAT CAC GGA GCA ATC AGT
SMC31CUQ¹	(TC) ₁₀ (AC) ₂₂	138-234	CAT GCC AAC TTC CAA TAC AGA CT	AGT GCC AAT CCA TCT CAG AGA
SMC336BS¹	(TG) ₂₃ (AG) ₁₉	141-239	ATT CTA GTG CCA ATC CAT CTC A	CAT GCC AAC TTC CAA ACA GAC
SMC569CS¹	(TG) ₃₇	167-237	GCG ATG GTT CCT ATG CAA CTT	TTC GTG GCT GAG ATT CAC ACT A
SMC22DUQ¹	(CAG) ₅ C (AGG) ₅	147-163	CCA TTC GAC GAA AGC GTC CT	CAA GCG TTG TGC TGC CGA GT
CV 29²	(ATCT) ₁₄	85-151	TCG CGT CCA CCA ATG TAA CC	GCG TGC ATC GCT TGT GTC TT
CV 37²	(TTTC) ₁₅	114-171	GGA TGG ACG ACG TGT CCT GG	ATA AAG TGG CCG CTT GGA TTG A
CV 38²	(CTTTT) ₁₈	93-214	GAA GCA GGG GCC TCA AGT TG	GTC AAA CAG GCG ATC TGG CTC

¹Pan (2006)

²Maccheroni et al. (2009)

Os locos CV29, CV37 e CV38 apresentaram ampliações fortes e maior número de alelos (Tabela 2). O conjunto de *primers* selecionados possibilitou a obtenção de 72 fragmentos (alelos). Destes, 10 foram monomórficos e amplificados em todas as variedades testadas, resultando em 62 alelos úteis para genotipagem dos oito cultivares.

Tabela 2 – Caracterização do conjunto de alelos gerados pelos oito locos de microssatélites amplificados em oito genótipos de cana-de-açúcar.

Marcador SSR								
	SMC24DUQ	SMC31CUQ	SMC336BS	SMC569CS	SMC22DUQ	CV29	CV37	CV38
	150	210	212	166	170	144	170	188
	142	179	191	163	168	139	168	185
	138	174	184	161	166	135	166	175
	136	172	178	157	164*	130*	162	173
	133*	170	176	154	162*	125	156	170
	131*	168	173	150	160	123	154	156
	129	166				120	149	154
Alelos (pb)						115	146	152
						112	128	149
						107	125	144
						102	122*	123
						98	118*	122
						90		118
								112
								108
Nº de alelos	7	7	6	6	6	13	12	15

* Representa bandas monomórficas encontradas no conjunto de genótipos avaliados

Avaliação de progênies S1

Os locos CV29, CV37 e CV38 foram utilizados para a confirmação de autofecundação nas famílias: 1) RB867515; 2) RB928064; 3) RB865230; 4) RB855536; 5) RB855156. Um total de 46 indivíduos foi utilizado para comparação do padrão de bandas com o padrão apresentado pelo genitor, e somente aqueles que apresentaram nitidez satisfatória que possibilitasse a inspeção visual das bandas foram considerados na análise, classificando os demais como amostras perdidas. Para se confirmar um indivíduo como *self* foi utilizado um par de locos de microssatélites. Assim, se a partir de um determinado loco um indivíduo qualquer é classificado como *self*, essa informação deve ser validada também no outro loco analisado. A Tabela 3 apresenta as taxas de autofecundação encontradas no presente trabalho, expressas como porcentagem do total de indivíduos S1's em relação ao número de progênies avaliadas.

Tabela 3 - Genitores avaliados por meio de locos microssatélites para confirmação de autofecundação.

Família	Sexo ¹	Locos avaliados	% Autofecundação
RB867515	I	CV37 e CV38	83,3
RB928064	F	CV37 e CV38	89,3
RB865230	I	CV29 e CV37	91,3
RB855536	M	CV29 e CV38	97,6
RB855156	F	CV37 e CV38	71,7

¹ Sexo determinado pela avaliação visual da viabilidade polínica na Estação de Cruzamentos da Serra do Ouro: I, intermediário; F, fêmea; M, macho.

DISCUSSÃO

Seleção de marcadores SSR

Vários fatores interferem na genotipagem baseada em marcadores microssatélites, como: o número de locos SSR, a classe do marcador (tipo de repetição nucleotídica) e as técnicas empregadas na detecção de marcas polimórficas, influenciando também no número médio de alelos encontrado.

A qualidade de amplificação do loco foi o principal critério utilizado na seleção dos marcadores. Neste trabalho, de um total de 24 *primers* pré-selecionados, oito locos SSR (33%) produziram amplificações consistentes em gel de poliacrilamida. Patreze (2008) relaciona a taxa de sucesso de *primers* SSR com o tamanho do genoma da espécie. Em genomas de tamanho grande, como a cana-de-açúcar (2C = 10.000 Mpb; D'Hont, 2005) a proporção de DNA alvo e não-alvo é reduzida; assim a taxa de sucesso do conjunto de *primers* SSR testados pode ser reduzida, assim como a possibilidade de ligação não-específica em regiões complementares a qualquer região de 20pb (tamanho médio de um oligonucleotídeo iniciador). Pan (2006) avaliou o potencial de 221 marcadores microssatélites genômicos (gSSR) para caracterização molecular de germoplasma de cana-de-açúcar. Utilizando uma plataforma automatizada baseada em eletroforese capilar, apenas 67 *primers* (30 %) produziram amplificações consistentes.

Os oito locos geraram um total de 72 alelos, sendo que 10 (13,8 %) foram monomórficos, produzindo fragmentos em todos os genótipos estudados (Tabela 2). Cordeiro et al. (2000) encontraram 9 % de fragmentos monomórficos em 100 locos de gSSRs desenvolvidos para cana-de-açúcar e testados em cinco cultivares, entre

elas duas ancestrais relacionadas a *S. officinarum* e *S. spontaneum*. Pan (2006) obteve 25 % de marcas monomórficas em 67 marcadores gSSR testados em cinco cultivares comerciais. Pinto et al. (2006) estimaram 17 % e 9 % de fragmentos monomórficos em 51 EST-SSRs e 50 locos de gSSR, respectivamente, testados em 13 clones comerciais. Espera-se que um aumento no número de locos estudados propicie a obtenção de um maior número de marcas polimórficas; contudo, o tempo e custo para otimização das condições de amplificação para cada loco SSR deve ser levado em consideração.

O grau de polimorfismo em cada loco varia de acordo com a população avaliada e o número de indivíduos caracterizados. O número menor de alelos encontrados era esperado uma vez que apenas oito locos se mostraram robustos e apenas oito genótipos foram incluídos no estudo. Estes genótipos apresentam um *pedigree* relacionado, com alguns deles compartilhando os mesmos genitores, como RB865230 e RB855536 ([SP70-1143 x RB72454]).

Outro fator importante para obtenção de marcas úteis para avaliação molecular é a composição da unidade repetitiva do microsatélite. Os locos SSR dinucleotídeos embora tendem a apresentar maior número de alelos, são de difícil avaliação quanto à determinação dos alelos. Neste estudo, grande número de locos SSR apresentaram artefatos de amplificação, principalmente bandas *stutter* (Figura 2). Essas amplificações são conjuntos de bandas separadas umas das outras por um ou dois pares de base, resultantes do escorregamento da DNA polimerase durante a PCR (*slippage*), geralmente caracterizadas por deleções de 2 pb na região repetida. Em análises automatizadas, tais bandas interferem na determinação de quais picos correspondem aos alelos verdadeiros, dificultando ainda mais a correta genotipagem quando se faz a avaliação visual de gel de poliacrilamida corado com nitrato de prata

(Weising et al., 2005). Algumas medidas poderiam ter sido utilizadas para se minimizar a ocorrência de artefatos, como a inclusão de formamida, albumina de soro bovino ou dimetil sulfóxido, redesenho do *primer* reverso, programação de PCR pelo uso da técnica do *touchdown*, porém tais medidas tornariam a análise onerosa para todos os locos pré-selecionados.

Microssatélites compostos por repetições de tri-, tetra- e pentanucleotídeos são menos abundantes no genoma e geralmente exibem menor polimorfismo que repetições de mono- e di-nucleotídeos. Todavia, estão menos sujeitos à amplificação de bandas *stutter*. Os locos CV29, CV37 e CV38 produziram maior número médio de alelos por marcador (13,3) em relação aos locos SMC24DUQ, SMC31CUQ, SMC336BS, SMC569CS e SMC22DUQ (6,4). Pinto et al. (2006) relatam que, de maneira geral, não há uma grande diferença em relação ao polimorfismo entre gSSRs e EST-SSRs, apesar da tendência deste último apresentá-lo em menor grau.

Neste estudo, os locos CV29, CV37 e CV38 são compostos por repetições de tetra-, tetra- e pentanucleotídeos, respectivamente, mas apresentaram maior nível de polimorfismo que as demais classes de microssatélites avaliadas (Tabela 2). Tais locos foram gerados a partir de sequências públicas denominadas ESTs (do inglês *expressed sequence tags*), correspondendo a regiões transcritas do genoma e potencialmente relacionadas a genes de interesse agrônômico. Por estarem relacionados à regiões gênicas, estão menos sujeitos à pressão de seleção e mutações, pois tendem a se manter conservadas entre espécies ou mesmo gêneros, e alterações em suas estruturas poderiam acarretar em prejuízos adaptativos à espécie (Cordeiro et al. 2001; Pinto et al., 2006; Maccheroni et al., 2009). O alto nível de polimorfismo dos locos CV29, CV37 e CV38 encontrado neste estudo em relação aos demais pode ser explicado por duas razões: 1) a construção dos primers foi baseada em sequências

de EST de cana-de-açúcar geradas pelo projeto brasileiro SUCCEST e a mineração dos marcadores foi feita entre milhares de sequências, comparando-se a robustez e efetividade dos primers em dois sistemas de detecção, PAGE e sequenciamento automático; 2) os testes de 112 marcas putativas selecionou apenas 3 sequências úteis para genotipagem de 1.205 genótipos de cana-de-açúcar, entre eles clones de grande expressividade nacional. Dessa maneira, a análise automática simultânea à detecção visual, bem como a seleção de marcas polimórficas em um grande número de genótipos permite a obtenção de um bom nível de polimorfismo.

A Figura 3 ilustra o perfil eletroforético dos locos microssatélites CV37 e CV38, mostrando o polimorfismo apresentado por esses locos entre oito genótipos avaliados.

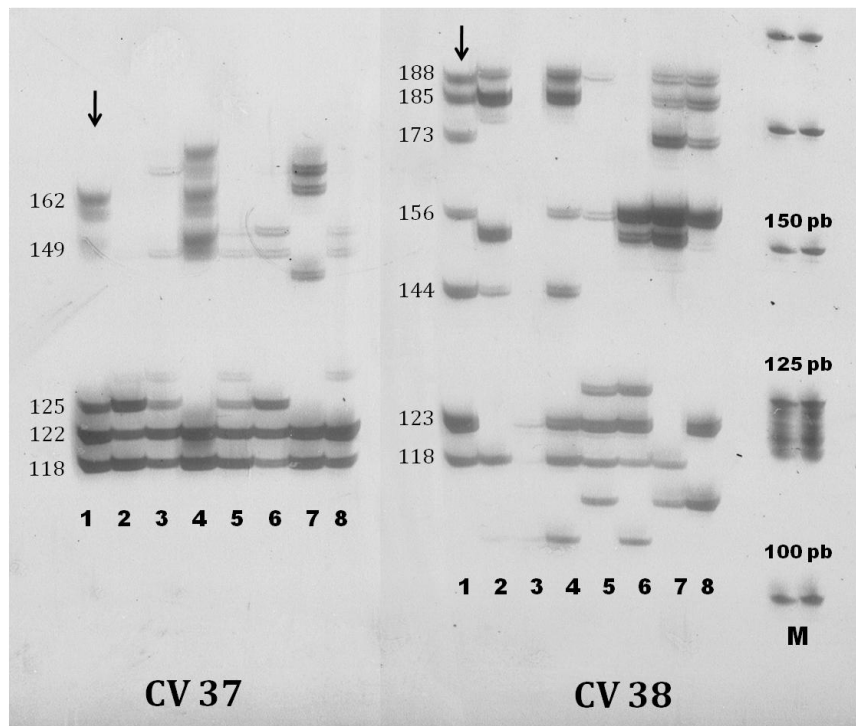


Figura 3 – Imagem de gel de poliacrilamida 6%, corado com nitrato de prata, contendo produtos de amplificação dos locos microsatélites CV37 e CV38 de oito genótipos de cana-de-açúcar. A seta corresponde ao padrão de bandas do genótipo 1 com o tamanho dos seus respectivos alelos amplificados para o loco em questão indicado à esquerda. M: marcador de peso molecular de 25 pb (Promega®). 1-RB867515, 2-RB928064, 3-RB865230, 4-RB855536, 5-RB855156, 6-RB739359, 7-SP80-1816 e 8-RB925345.

Avaliação de progênies S1

Hibridização fluorescente *in situ* e genes rDNA indicaram que os 80 cromossomos de *S. officinarum* se encontram organizados em 8 cópias homólogas, de um conjunto básico de 10 cromossomos diferentes ($2n = 8x = 80$), enquanto que os 40 a 128 cromossomos de *S. spontaneum* estão organizados em 5 a 16 cópias homólogas, com conjunto básico de 8 cromossomos diferentes ($2n = 8x = 40-128$) (D'Hont et al., 1998). No genoma dos cultivares modernos de cana-de-açúcar cada cromossomo de base está presente em dez a doze exemplares homólogos. Em média, um loco é representado por dez alelos (Waclawovsky et al., 2010).

Os marcadores microssatélites têm herança codominante devido à capacidade de distinguir entre os homozigotos e heterozigotos para o loco em questão. Quando se trata de organismos poliplóides, a grande quantidade de fragmentos gerados, que podem representar os diferentes alelos do mesmo loco nos vários cromossomos homólogos envolvidos, dificulta a identificação dos genótipos (Oliveira, 2006) (Figura 3).

Três locos microssatélites, CV29, CV37 e CV38 foram úteis para avaliação de indivíduos S1 de cana-de-açúcar, pois apresentaram padrão de bandas com maior nitidez e possibilitaram melhor dimensionamento dos alelos. A ocorrência de bandas nítidas e ausência de artefatos de amplificação são fatores essenciais para se avaliar a utilidade de marcas polimórficas para a determinação de parentesco ou confirmação de cruzamentos empregando-se um sistema de genotipagem baseado em eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE). Nesse estudo, empregou-se gel na concentração de 6%, tendo se alcançado boa qualidade visual. Entretanto, alguns autores relatam o emprego de maiores concentrações de poliacrilamida para "dissolver" a

interferência de bandas inespecíficas e artefatos de amplificação (Cordeiro et al., 2000; Manigbas e Villegas, 2004; Weising et al., 2005).

Tendo em vista o caráter subjetivo da interpretação dos produtos de amplificação, muitas amostras foram excluídas das análises por apresentar bandas difusas e/ou falhas de amplificação (Tabela 3). As taxas de autofecundação (proporção de *selfs* confirmados em relação ao total de indivíduos avaliados) variaram de 20 a 58,1% entre as famílias amostradas, não havendo uma relação clara entre o número de progênies amostradas e a taxa de autofecundação (Tabela 3). Espera-se uma relação positiva entre o aumento de indivíduos amostrados em famílias S₁ e a proporção de indivíduos endogâmicos encontrados. A existência de progênies "contaminantes" comprova a característica proporção de híbridos e *selfs* compondo populações F1 de cana-de-açúcar, devido à biologia floral da espécie.

McIntyre e Jackson (2001) utilizaram amostras de 28 a 38 indivíduos em oito cruzamentos biparentais para se determinar o nível de autofecundação por meio de marcadores RAPD (3 ou 4 bandas específicas para cada cruzamento), obtendo taxas de 0 a 17,6% de autofecundação. Manigbas e Villegas (2004) relataram um número mínimo de 100 progênies para se avaliar com confiabilidade a proporção de híbridos em cruzamentos. Eles avaliaram quatro cruzamentos com 195, 240, 255 e 228 progênies cada, obtendo uma proporção de 18%, 53%, 13% e 25% de autofecundações, respectivamente, por meio de um loco microssatélite com 17 marcas polimórficas.

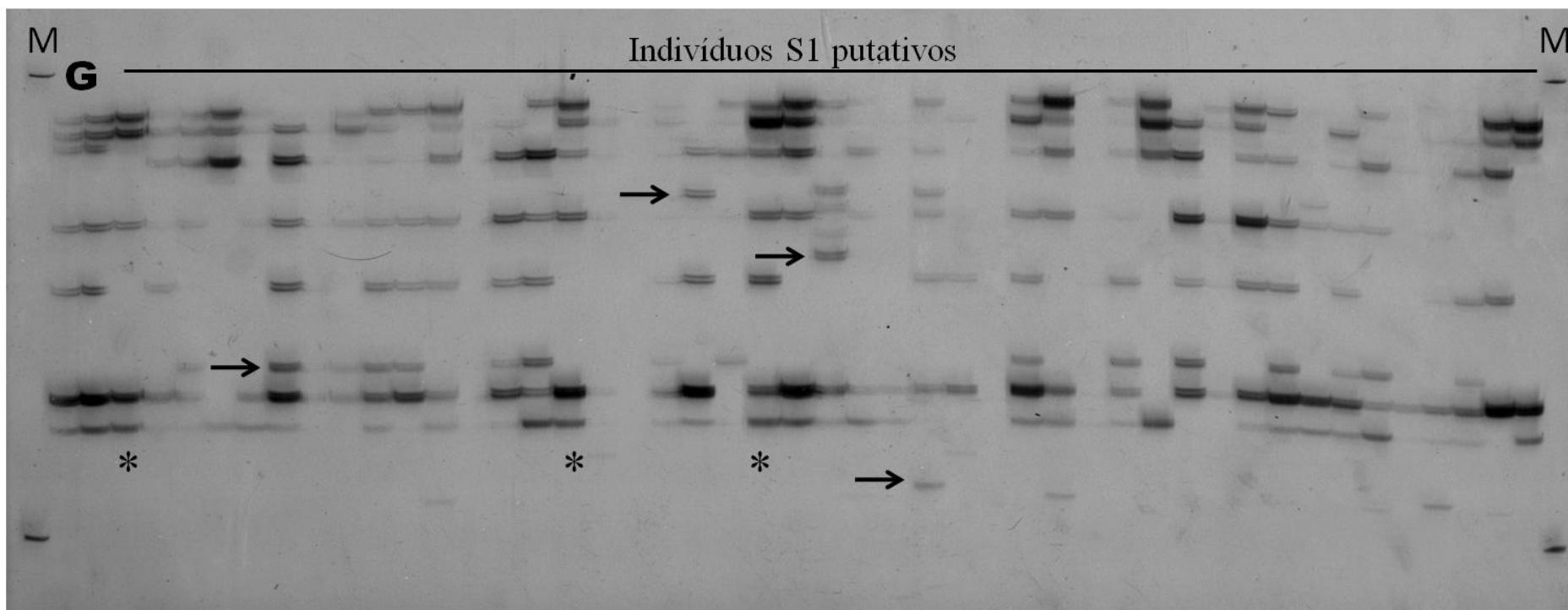


Figura 4 - Imagem de gel de poliacrilamida 6% corado com nitrato de prata contendo produtos de amplificação do loco microssatélite CV38. As duas primeiras canaletas representam o genitor RB867515 (**G**) e as demais os indivíduos S1 putativos resultantes de autofecundação. **M**: marcador de pelo molecular DNA ladder 100 pb (Invitrogen®);

▲ : exemplos de falhas, bandas difusas ou artefatos de amplificação;

* : exemplos de indivíduos S1 confirmados;

➔ : exemplos de alelos contaminantes.

Por outro lado, Tew e Pan (2010) utilizaram amostras de 87 progênies em sete policruzamentos e encontraram taxas de 0 a 45 % de autofecundação por meio de sete locos microssatélites (51 alelos) detectados por meio de plataforma automatizada. Segundos esses autores, ao se empregar um maior número de marcadores aumenta-se a taxa de identificação do genitor masculino em policruzamentos de cana-de-açúcar, embora quanto maior o número de marcas presentes no genitor feminino, menor a probabilidade de se determinar a paternidade.

O número de marcas geradas neste estudo possibilita o emprego dos três locos microssatélites para a avaliação das progênies S_1 e o menor número de locos pode ser compensado por uma maior resolução na detecção dos alelos visualmente, bem como por sua maior proporção de bandas. De acordo com Bernatchez e Duchesne (2000), o número de alelos por loco e o número de locos disponíveis interagem simultaneamente para o aumento da acurácia na designação de parentesco em populações naturais. Todavia, não existem modelos estatístico-matemáticos preditivos para se determinar a combinação ótima.

Quando se tem por objetivo a confirmação de indivíduos S_1 provenientes de autofecundações de clones de cana-de-açúcar, com vistas à utilização destes indivíduos endogâmicos em um esquema de seleção recorrente recíproca individual, o uso dos locos CV29, CV37 e CV38 confere boa confiabilidade aos resultados. Embora muitos indivíduos foram desconsiderados na análise final, esta estratégia não discredita a metodologia para o objetivo proposto. Uma vez selecionados clones S_1 promissores com base no desempenho agrônômico, estes podem ser analisados por meio dos locos microssatélites para comprovar sua origem por autofecundação.

Um menor número de amostras permitiria a execução de duplicatas e triplicatas no sistema de genotipagem por eletroforese em gel de poliacrilamida, não

incluídas no presente trabalho devido à operacionalização da análise e aos objetivos previamente delineados.

CONCLUSÕES

Oito locos microssatélites são recomendados para análise molecular de genótipos de cana-de-açúcar, sendo três deles (CV29, CV37, CV38) mais adequados para avaliação em um sistema de genotipagem baseado em géis de poliacrilamida.

A avaliação molecular de locos microssatélites possibilita a confirmação de clones S_1 com confiabilidade, permitindo o emprego dos indivíduos endogâmicos em um esquema de seleção recorrente recíproca individual.

REFERÊNCIAS

- BARBOSA, M.H.P. e SILVEIRA, L.C.I. Melhoramento Genético e Recomendação de Cultivares. In: Santos, F.; Borém, A. e Caldas, C. Editores. **Cana-de-açúcar: Bioenergia, Açúcar e Álcool - Tecnologias e Perspectivas**. Viçosa, MG – Suprema, 578 p. 2010.
- BERNATCHEZ, L.; DUCHESNE, P. Individual-based genotype analysis in studies of parentage and population assignment: how many locos, how many alleles? **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, Ottawa, v. 57, p. 1-12, 2000.
- BORÉM, A. e CAIXETA, E.T. (Ed.). **Marcadores Moleculares**. 2^a ed. Editora Viçosa-Viçosa, MG. 532 p. 2009.
- BRASIL. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da Safra Brasileira: cana-de-açúcar. 1º Levantamento da Cana-de-Açúcar Safra 2011/2012**. Mai/2011. Brasília : Conab, 2011. 19 p. Disponível em <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/11_05_27_11_53_13_boletim_cana_portugues_-_maio_2011_1o_lev..pdf> Acesso em: 02 de Jul. 2011.
- BRITO, G. G.; CAIXETA, E. T.; GALLINA, A. P.; MACIEL-ZAMBOLIM, E.; ZAMBOLIM, L.; DIOLA, V.; LOUREIRO, M. E. Inheritance of coffee leaf rust resistancion and identification of AFLP markers linked to the resistance gene. **Euphytica**, V.173, p.255-264, 2010.
- CASSALETT, C.; VIVEROS, C.A.; PIZZA, L.R. Self pollination in sugarcane hybrids, *Saccharum* sp. In: COCK, J.H.; BREKELBAUM, T. (eds). **Proceedings of the XXII Congress of the International Society of Sugarcane Technologists in the 1995**. V.22. p.312-315. 1996.
- CHEN, P. H.; PAN, Y.-B.; CHEN, R.-K.; XU, L.-P.; CHEN, Y.-Q. SSR marker-based analysis of genetic relatedness among sugarcane cultivars (*Saccharum* spp. hybrids) from breeding programs in China and other countries. **Sugar Tech** 11(4):347-354. 2009.
- CORDEIRO, G.M.; TAYLOR, G.O. and HENRY, R.J. Characterisation of microsatellite markers from sugarcane (*Saccharum* sp.), a highly polyploid species. **Plant Sci**. 155, 161–168. 2000.
- CORDEIRO, G.M.; CASU, R.; McINTYRE, C.L.; MANNERS, J.M.; HENRY, R.J. Microsatellite markers from sugarcane (*Saccharum* sp.) ESTs transferable to *Erianthus* and sorghum. **Plant Sci**. 160:1115–1123. 2001.
- CORDEIRO, G.M.; PAN, Y.-B; HENRY, R.J. Sugarcane microsatellites for the assessment of genetic diversity in sugarcane germplasm. **Plant Sci**. 165:181–189. 2003.

- D'HONT, A.; ISON, D.; ALIX, K.; ROUX, C.; GLASZMANN, J.C. Determination of basic chromosome number in the genus *Saccharum* by physical mapping of ribosomal RNA genes. **Genome** 41:221–225. 1998.
- D'HONT, A. Unraveling the genome structure of polyploids using FISH and GISH; examples of sugarcane and banana. **Cytogenet Genome Res** 109:27–33. 2005.
- DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plants DNA from fresh tissue. **Focus**. v.12. p.13-15. 1990.
- ETHIRAJAN, S.A.; SANTHAKUMARIAMMA, P.N.; VELAYUTHAM, N. Studies on successive inbred generations of selected sugarcane cultivars. In: REIS, F.S.; DICK, J. (eds.). **Proceedings of the XVI Congress of International Society of Sugarcane Technologists in the 1977**. ISSCT, São Paulo. p.269-273. 1978.
- FERREIRA, F.M. et al. Effects of inbreeding on the selection of sugar cane clones. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.5, p.174-182, 2005.
- HEINZ, D.J.; AND T.L. TEW. Hybridization procedures. p.313–342. In D.J. Heinz (ed.) **Sugarcane improvement through breeding**. Elsevier, Amsterdam. 1987.
- HOGARTH, D.M. The effect of accidental selfing on the analysis of a diallel cross with sugarcane. **Euphytica**. v.29. p.737-746. 1980.
- LANES, E. C. M.; MIRANDA, G. V.; FUSCALDI, J. L. et al. Otimização da metodologia de extração de DNA genômico em plantas de milho para análises de SSR. **Anais do V Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas**. Guarapari - ES : Sociedade Brasileira de Melhoramento de Plantas, 2009.
- MACCHERONI, W.; JORDAO, H.; DE GASPARI, R.; DE MOURA, G.L.; MATSUOKA S. Development of a dependable microsatellite-based fingerprinting system for sugarcane. **Sugar Cane Intl**. 27(2):47-52. 2009.
- MACHADO JUNIOR, R.; WALKER, D.I.; BRESSIANI, J.A.; DA SILVA, J.A.G. Emasculation of sugarcane tassels using hot water. In: **International Society of Sugar Cane Technologists Congress**, 22. Cartagena, 1996. Proceedings. Cali: Tecnicaña, p. 346-352. 1996.
- MANIGBAS, N.L. e VILLEGAS, L.C. Microsatellite markers in hybridity tests to identify true hybrids of sugarcane. **Philippine Journal of Crop Science**. 29 (2):23-32. 2004.
- MATSUOKA, S.; GARCIA, A.A.F.; CALHEIROS, G.G. Hibridação em Cana-de-Açúcar. In: Borém, A. (Ed.) **Hibridação Artificial de Plantas**. Editora UFV: Viçosa, 625p. 2009.
- McINTYRE, C.L.; JACKSON, P.A. Low level of selfing found in a sample of crosses in Australian Sugarcane Breeding Programs. **Euphytica**. v.117. p.245-249. 2001.

- OLIVEIRA, K.M. **Desenvolvimento de marcadores moleculares EST-SSRs e mapeamento funcional de cana-de-açúcar**. Tese de Doutorado. Universidade de Campinas, Instituto de Biologia. Campinas, SP: [s.n.]. 165p. 2006.
- PAN, Y.-B., CORDEIRO, G.M., RICHARD JR., E.P.; HENRY, R.J. Molecular genotyping of sugarcane clones with microsatellite DNA markers. **Maydica** 48:319–329. 2003.
- PAN, Y.-B. Highly polymorphic microsatellite DNA markers for sugarcane germplasm evaluation and variety identity testing. **Sugar Technol.** 8:246–256. 2006.
- PATREZE, C.M. **Análise molecular da diversidade genética em uma população natural de Araucaria angustifolia (Bertol.) Kuntze no Estado de São Paulo**. Tese de Doutorado. Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo. Piracicaba, 127p. 2008.
- PINTO, L.R.; OLIVEIRA, K.M.; MARCONI, T.; GARCIA, A.A.F.; ULIAN, E.C.; SOUZA, A.P. Characterization of novel sugarcane expressed sequence tag microsatellites and their comparison with genomic SSRs. **Plant Breed** 125:378–384. 2006.
- PIPERIDIS, G.; PIPERIDIS, N.; D’HONT, A. Molecular cytogenetic investigation of chromosome composition and transmission in sugarcane. **Mol Genet Genomics** 284(1):65–73. 2010.
- RESENDE, M.D.V.; BARBOSA, M.H.P.B. **Melhoramento genético de plantas de propagação assexuada**. Colombo: Embrapa Florestas. 130p. 2005.
- SILVA, M.A.; GONCALVES, P.S. Inbreeding in sugarcane varieties. **Ciência Rural**, v.41, n.4, abr, 2011.
- STEVENSON, G.C. **Genetics and Breeding of Sugarcane**. Longmans, London, 284p. 1965.
- TEW, T.L. and PAN, Y-B. Microsatellite (simple sequence repeat) marker-based paternity analysis of a seven-parent sugarcane polycross. **Crop Sci.** 50:1401–1408. 2010.
- UNICA. União da Indústria de Cana-de-Açúcar. Perspectivas para os mercados de açúcar e etanol. Apresentação feita pelo presidente da Unica Marcos Jank. Maio de 2011. Disponível em: < <http://www.unica.com.br/multimedia/apresentacao/>>. Acesso em 02 de jul. 2011a.
- UNICA. União da Indústria de Cana-de-Açúcar. A cana-de-açúcar na matriz energética brasileira. Apresentação de Luiz A. Horta Nogueira. Disponível em: < <http://www.unica.com.br/multimedia/apresentacao/>>. Acesso em 02 de jul. 2011b.
- WACLAWOVSKY, A. J.; SATO, P. M.; LEMBKE, C. G.; MOORE, P. H.; SOUZA, G. M. Sugarcane for bioenergy production: an assessment of yield and regulation of sucrose content. **Plant Biotechnology Journal**, 8: 263–276. 2010.

WEISING, K., NYBOM, H., WOLFF, K., KAHL, G. **DNA Fingerprinting in Plants: Principles, Methods and Applications**. 2^a edição. CRC Press – Taylor & Francis Group. 444p. 2005.

WU, K.K.; BURNQUIST, W.L.; SORRELLS, M.F.; TEW, T.L.; MOORE, P.H.; TANKSLEY, S.D. The detection and estimation of linkage in polyploids using single-dose restriction fragments. **Theor. Appl. Genet.** 83:294–300. 1992.