

**Viabilidade Polínica de
Genótipos do Complexo
Saccharum spp.
para Cruzamentos, Obtenção
de Sementes e Plantas**



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Tabuleiros Costeiros
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 86

Viabilidade Polínica de Genótipos do Complexo *Saccharum* spp. para Cruzamentos, Obtenção de Sementes e Plantas

*Adriane Leite do Amaral
Tassiano Maxwell Marinho Câmara
João Messias dos Santos
Luiz Sérgio Costa Duarte Filho
Geraldo Veríssimo de Souza Barbosa*

Embrapa Tabuleiros Costeiros

Av. Beira Mar, 3250

49025-040 Aracaju, SE

Fone: (79) 4009-1344

Fax: (79) 4009-1399

www.cpatc.embrapa.br

www.embrapa.com.br/fale-conosco

Comitê Local de Publicações da Embrapa Tabuleiros Costeiros

Presidente: *Marcelo Ferreira Fernandes*

Secretária-executiva: *Raquel Fernandes de Araújo Rodrigues*

Membros: *Alexandre Nízio Maria, Ana da Silva Lédo, Ana Veruska Cruz da Silva Muniz, Élio César Guzzo, Hymerson Costa Azevedo, Josué Francisco da Silva Junior, Julio Roberto de Araujo Amorim, Viviane Talamini e Walane Maria Pereira de Mello Ivo*

Supervisão editorial: *Raquel Fernandes de Araújo Rodrigues*

Normalização bibliográfica: *Lucidalva Ribeiro G. Pinheiro*

Editoração eletrônica: *Arthur Henrique C. Godofredo*

Foto da capa: *Saulo Coelho Nunes*

1ª Edição (2014)

On-line (2014)

Todos os direitos reservados

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**Embrapa Tabuleiros Costeiros**

Viabilidade polínica de genótipos do complexo *Saccharum* ssp. para cruzamentos, obtenção de sementes e plantas / Adriane Leite do Amaral... [et.al.]. - Aracaju : Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2014.

31 p. (Boletim de Pesquisa / Embrapa Tabuleiros Costeiros, ISSN 1678-1961, 86).

1. Cana-de-açúcar. 2. Cruzamento vegetal. 3. Reprodução Vegetal. I. Amaral, Adriane Leite do. II. Título. III. Série.

CDD 641.336 1 (21.ed.)

© Embrapa 2014

Sumário

Resumo	5
Abstract	7
Introdução	8
Material e Métodos	10
Resultados e Discussão	22
Conclusões	29
Referências	31

Viabilidade Polínica de Genótipos do Complexo *Saccharum* ssp. Para Cruzamento, Obtenção de Sementes e de Plantas

Adriane Leite do Amaral¹

Tassiano Maxwell Marinho Câmara²

João Messias dos Santos³

Luiz Sérgio Costa Duarte Filho⁴

Geraldo Veríssimo de Souza Barbosa⁵

Resumo

A pesquisa foi desenvolvida de 2012 a 2014 na Estação de Floração e Cruzamentos de Serra do Ouro (EFCO), em Murici-AL, onde está localizado o Banco Ativo de Germoplasma da Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroenergético (BAG - RIDESA). O objetivo principal foi estimar a viabilidade polínica de genitores do Complexo *Saccharum* spp. e realizar cruzamentos artificiais, intra e interespecíficos, para a obtenção de plantas. Estimativas da viabilidade polínica foram realizadas através de análises de Integridade celular e de germinação in vitro para validar genitores masculinos em cruzamentos. Um total de 62 cruzamentos foram realizados com variedades comerciais (*Saccharum* sp.), canas doces (*S. officinarum*) e a espécie selvagem (*S. spontaneum*). Dois tipos de cruzamentos foram realizados. Para os cruzamentos entre genitores síncronos no florescimento foi utilizado pólen fresco e, para os genitores assíncronos, que florescem em momentos distintos, foi utilizado pólen conservado. Análises da viabilidade polínica, com estimativa média superior a 70% para

¹ Engenheira-agrônoma, doutora em Melhoramento Genético, pesquisadora da Embrapa Tabuleiros Costeiros, UEP - Rio Largo, AL.

² Engenheiro-agrônomo, doutor em Genética e Melhoramento, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, UEP - Rio Largo, AL.

³ Engenheiro-agrônomo, doutor em Biotecnologia e Melhoramento, professor da Universidade Federal de Alagoas (UFAL).

⁴ Engenheiro-agrônomo, doutorando em Química e Biotecnologia na Universidade Federal de Alagoas (UFAL).

⁵ Engenheiro-agrônomo, doutor em Ciências, professor da Universidade Federal de Alagoas (UFAL).

integridade do pólen e superior a 16% para germinação in vitro confirmaram a fertilidade dos genitores masculinos e determinaram o êxito na realização dos cruzamentos com a obtenção de mais de 5 mil plantas.

Palavras-chave: cana-de-açúcar, cruzamentos interespecíficos, *S. spontaneum*, *S. officinarum*.

Pollinical Viability of the *Saccharum* Complex Genotypes for Crossings, Seeds and Plants Obtaining

Adriane Leite do Amaral

Tassiano Maxwell Marinho Câmara

João Messias dos Santos

Luiz Sérgio Costa Duarte Filho

Geraldo Veríssimo de Souza Barbosa

Abstract

*The research was conducted between the years 2012 and 2014 in Serra do Ouro Flowering and Crossing Breeding Station in the city of Murici-AL, where is located the Active Germplasm Bank which belongs to Interuniversity Network for the Development of the Sugar-Energy Industry (BAG RIDESA). The main objective of the research was to estimate the pollen viability of parents which belong to the “*Saccharum* Complex spp.” and perform artificial crossings, intra- and interspecific to obtain plants. Estimations of pollen viability were performed by analysis of cell integrity and in vitro germination to validate male parents in crosses. A total of 62 crossings were done with commercial varieties (*Saccharum* sp.), sweet canes (*S. officinarum*) and the wild species (*S. spontaneum*). Two types of crossings were performed. Crossings between genitors with synchronous flowering were done with fresh pollen, and between genitors that flowered at different moments, i.e. asynchronous genitors were done with stored pollen. Viability Analyses of pollen through of cellular integrity, with an average higher than 70% and above 16% for in vitro germination confirmed the male fertility of the genitors and justified the success of the interspecific crossings in which more than 5000 plants were obtained.*

Index terms: sugarcane, interspecific crossings, *S. spontaneum*, *S. officinarum*.

Introdução

A cana-de-açúcar pertence ao gênero *Saccharum*. Tradicionalmente as espécies descritas neste gênero são *Saccharum robustum*, *S. spontaneum*, *S. officinarum*, *S. sinense*, *S. barberi* e *S. edule*. Essas seis espécies juntamente com os gêneros *Narenga sp.*, *Sclerostachya sp.*, *Erianthus sp.* e *Miscanthus sp.* formam o Complexo *Saccharum* spp. (HENRY; KOLE, 2010).

As variedades modernas de cana-de-açúcar são híbridos (*Saccharum* sp.) provenientes do cruzamento entre *S. spontaneum* e *S. officinarum*, com retrocruzamentos sucessivos para o parental *S. officinarum*. O germoplasma de *S. spontaneum*, ou cana selvagem, é caracterizado pelo baixo conteúdo de açúcar, colmos finos, alto teor de fibra, alta capacidade de rebrota e resistência a estresses bióticos e abióticos. *S. officinarum*, ou canas doces, apresentam alto conteúdo de açúcar, colmos grossos, baixa fibra e baixa resistência a doenças. Com a estratégia de retrocruzamento para o parental de *S. officinarum*, num processo denominado de nobilitação, e com a posterior utilização dos híbridos interespecíficos como genitores em novos cruzamentos, os programas de melhoramento desenvolveram variedades com alta produtividade de açúcar, alta resistência a doenças e bons atributos para colheita (SINGH et al., 2010).

O sucesso obtido com as variedades modernas de cana-de-açúcar fez com que se reduzissem os esforços para inserir outros acessos de *S. spontaneum*, *S. officinarum*, ou outros clones do Complexo *Saccharum* spp. aos programas de melhoramento, que estariam baseados em poucos genitores ancestrais extensivamente inter cruzados. Assim, a variabilidade genética utilizada pelos melhoristas de cana-de-açúcar representa muito pouco da variabilidade genética existente no gênero *Saccharum* e menos ainda do Complexo *Saccharum* spp. Por esse motivo, os ganhos no melhoramento genético de cana-de-açúcar podem se apresentar cada vez mais restritivos (CRESTE et al., 2010).

As restrições nos ganhos genéticos e a tendência de demanda do mercado por genótipos com caracteres específicos, como aqueles relacionados a estresses bióticos e abióticos, adaptação específica a determinadas condições ambientais, propícios ao desenvolvimento de novos produtos e processos dentro da cadeia produtiva sucroenergética, e o aumento da demanda por fontes renováveis de energia, tem incentivado os programas de melhoramento a uma mudança de paradigma. No último século, os programas de melhoramento estiveram voltados a desenvolver cultivares com maior produtividade de açúcar. Atualmente, tem se verificado uma busca pelo desenvolvimento de canas com elevado rendimento de fibra, comumente referidas como “cana energia”.

Dentre as vantagens de desenvolver cultivares com mais fibras em detrimento ao açúcar destaca-se a obtenção de plantas mais vigorosas e rústicas. Estas seriam menos exigentes em clima, água e nutrientes, mais resistentes a pragas e doenças e com maior habilidade competitiva com plantas daninhas, resultando em maior unidade de energia produzida por energia gasta (CARVALHO NETO et al., 2014).

Essa mudança de paradigma nos programas de melhoramento exige a incorporação de novas fontes de germoplasma para o desenvolvimento de genótipos específicos. Dessa forma, faz-se necessária a exploração da grande variabilidade existente no Complexo *Saccharum* spp. Vários autores têm relatado, por exemplo, o alto grau de diversidade genética encontrado em coleções de *S. spontaneum*. Essa espécie tem sido considerada como a de maior diversidade entre as espécies de *Saccharum* e é responsável por parte da variabilidade existente entre cultivares de cana-de-açúcar (PAN et al., 2004; MARY et al., 2006; SINGH et al., 2010). Alta produtividade, boa capacidade de perfilhamento, maior resistência a patógenos e pragas, maior capacidade de rebrota após vários cortes, e alta porcentagem de fibra são características encontradas em acessos de *S. spontaneum* que poderiam ser transferidas aos novos genótipos (CRESTE et al., 2010; CARVALHO-NETTO et al., 2014).

Uma das principais dificuldades enfrentadas por programas de melhoramento de cana-de-açúcar é promover o florescimento sincronizado de parentais para a realização de cruzamentos. Na utilização de acessos do Complexo *Saccharum* spp. as dificuldades podem se acentuar, principalmente porque a grande maioria dos genótipos é selvagem e proveniente de regiões diversas àquelas nas quais estão sendo introduzidos. A conservação de pólen pode ser uma alternativa para minimizar dificuldades de sincronia em cruzamentos e, especialmente pela perspectiva de utilização da variabilidade genética existente no Complexo *Saccharum* spp. Dentro desta perspectiva, o trabalho teve como objetivo estimar a viabilidade polínica de genitores do Complexo *Saccharum* spp. e realizar cruzamentos artificiais, intra e interespecíficos, para a obtenção de plantas.

Foto: Geraldo Veríssimo de S. Barbosa



Figura 1. Foto aérea da Estação de Floração e Cruzamento da Serra do Ouro (EFCSCO) da RIDESA/UFAL, Murici-AL.

Material e Métodos

Os estudos foram realizados na Estação de Floração e Cruzamentos de Serra do Ouro (EFCSCO), em Murici-AL, onde está localizado o banco ativo de germoplasma (Figura 1) da Rede Interuniversitária para

o Desenvolvimento do Setor Sucroenergético (RIDESA). A EFCSO, pertencente à Universidade Federal de Alagoas-UFAL, conta com mais de 3.000 acessos de cana-de-açúcar e espécies relacionadas.

Os trabalhos foram desenvolvidos entre os anos de 2012 e 2014 no período habitual de cruzamentos na EFCSO, entre os meses de março e julho. Como fonte de germoplasma foram selecionados genótipos de canas doces (*Saccharum officinarum*), genótipos de cana selvagem (*S. spontaneum*) e de variedades comerciais do programa da RIDESA e de outras instituições de pesquisa (*Saccharum* sp.) (Figura 2).



Figura 2. a) Variedade comercial (*Saccharum* sp.), b) canas doces (*S. officinarum*) e c) exemplares de espécie selvagem (*S. spontaneum*) na Estação de Floração e Cruzamentos da Serra do Ouro (EFCSO) da RIDESA/UFAL, Murici-AL (2014).

Como genitores masculinos e femininos foram utilizados genótipos com ciclo preferencialmente precoce e intermediário, respectivamente, para propiciar a obtenção de cruzamentos assíncronos utilizando pólen conservado nos anos de 2012 e 2013. Em 2014, foi dada prioridade a cruzamentos utilizando como macho pólen fresco de *S. spontaneum*. As fêmeas utilizadas foram àquelas aptas ao cruzamento quando da coleta do pólen dos machos. Também, foi coletado pólen de acessos de *S. officinarum* para comparação de viabilidade entre as espécies.

Para classificação dos genótipos quanto à época de florescimento foram tabuladas as informações referentes a 10 anos (2005-2014) de levantamento do florescimento dos genótipos realizado na EFCSO, com exceção dos acessos de *S. spontaneum*, com apenas dois anos de registro de florescimento (2013 e 2014) porque são de introdução recente no BAG. Os genótipos foram classificados como precoce (P), intermediário (I) ou tardio (T), de acordo com a ocorrência de florescimento espontâneo nos períodos de março-abril, maio-junho e a partir de julho, respectivamente.

Para obtenção do pólen, cinco inflorescências para cada material em estado de antese foram colhidas por volta das oito horas da manhã, seguindo metodologia descrita por AMARAL et al. (2012). No laboratório, as inflorescências foram agitadas sobre superfície lisa para a extração de grãos-de-pólen e anteras. As amostras foram imediatamente acondicionadas em frascos plásticos com tampa rosca (80 mL) e armazenadas em freezer a 18°C negativos, por 30 dias, para posterior cruzamento, à exceção de 2014 onde o pólen foi imediatamente utilizado no cruzamento. Tanto no momento da coleta quanto no momento precedente à utilização, as amostras de pólen foram analisadas quanto à viabilidade (através da integridade citológica e germinação in vitro). Somente amostras com germinação (presença de tubo polínico) (Figura 3) diferente de zero, na avaliação in vitro, foram utilizadas nos cruzamentos.

Fotos: Adriane Leite do Amaral

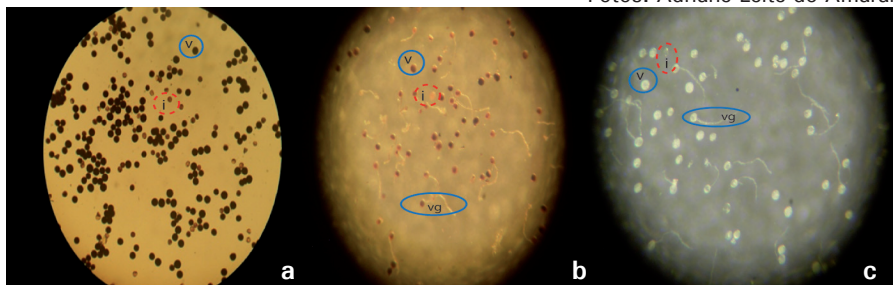


Figura 3. Análise de viabilidade do pólen de cana-de-açúcar em microscópio estereoscópico (40X): a) integridade citológica com corante Lugol; b) germinação in vitro com corante Lugol; c) germinação in vitro sem corante Lugol (grãos-de-pólen: v = viável, i = inviável, vg = viável e germinado).

Os procedimentos de coleta, armazenamento, avaliação de viabilidade e utilização do pólen nos cruzamentos seguiram as recomendações descritas por Amaral et al. (2012). Para avaliação da Integridade citológica, uma amostra de pólen foi depositada em lâmina de vidro e corada com solução de Lugol (1 grama de iodo, 2 gramas de iodeto de potássio e 100 mL de água destilada). A lâmina foi acoplada ao microscópio estereoscópio com aumento de 40x e o campo luminoso fotografado com câmera digital. A imagem capturada foi dividida em quatro quadrantes, equivalentes a quatro repetições, e os grãos de pólen foram avaliados como: i) grãos de pólen viáveis (corados em tons de marrom) função da presença de amido e da integridade da membrana, ou; ii) grãos de pólen inviáveis (amarelo pálidos e/ou translúcidos) por defeitos e/ou rompimento de membrana ou pela deficiência de reservas de amido. A relação entre grãos de pólen corados sobre o total foi utilizada para indicar a porcentagem de pólen viável (integridade) na amostra. Para germinação in vitro foi utilizado meio de cultura adaptado de Krishnamurthi (1977). Os procedimentos para análise foram semelhantes àqueles usados na avaliação de integridade, sendo que na preparação da lâmina foi adicionado o meio de cultura. A amostra foi deixada em repouso por uma hora e posteriormente os grãos de pólen foram corados com Lugol e contados. Nesse caso, além de grãos de pólen inviáveis e viáveis foram identificados também grãos viáveis germinados, com emissão de tubo polínico de comprimento superior ao diâmetro do próprio grão-de-pólen. Os dados foram anotados para a contagem e cálculo da porcentagem de pólen germinado (viabilidade in vitro).

Na realização dos cruzamentos foram seguidos os procedimentos habitualmente empregados na EFCSO, à exceção da etapa referente à polinização, que utilizou como genitor masculino pólen conservado ou fresco (Figura 4). Em síntese, os genitores femininos com florescimento em pelo menos um terço da panícula foram cortados rente ao solo, identificados e a base dos seus colmos foi imersa em solução nutritiva de *Mangelsdorf*, com reposição diária de nutrientes, segundo recomendação de Cesnick e Miocque (2004). As plantas foram levadas

para uma área sombreada onde passaram por uma limpeza de retirada das folhas, evitando-se o ressecamento prematuro dos colmos, e emasculadas através de imersão das panículas em água quente ($52,5^{\circ}\text{C}$) por 4,5 minutos (MACHADO JÚNIOR et al., 1996) para evitar autofecundações (Figuras 5). Os cruzamentos artificiais foram realizados polinizando-se as plantas com amostras de pólen armazenado (2012 e 2013) ou fresco (2014), mediante uso de pincéis (AMARAL et al., 2012). As plantas polinizadas foram levadas para campânulas, onde permaneceram por cerca de 20 dias para que se procedesse a fecundação, desenvolvimento e maturação das sementes (Figura 6).



Figura 4. Coleta do genitor masculino e extração do pólen para cruzamentos artificiais em cana-de-açúcar, na EFCO/RIDESA-UFAL, Murici, AL (2012): a) coleta das inflorescências no campo; b) manutenção das inflorescências em solução nutritiva para aguardar a antese; c) extração do pólen com pincel; d) manuseio do pólen para a polinização artificial.



Fotos: Adriane Leite do Amaral

Figura 5. Coleta do genitor feminino, preparo das inflorescências e emasculação para cruzamentos artificiais em cana-de-açúcar, na EFCO/RIDESA-UFAL, Murici, AL (2012): a) coleta das inflorescências no campo; b) manutenção das inflorescências em solução nutritiva; c) corte das folhas e limpeza dos colmos; d) emasculação das inflorescências em água quente.



Figura 6. Cruzamentos artificiais em cana-de-açúcar, na EFCSO/RIDESA-UFAL, Murici, AL (2012): a) genitor feminino sendo polinizado b) campo de cruzamento de cana-de-açúcar c) inflorescências após cruzamento e em fase de maturação das sementes.

Após esse período as sementes foram colhidas e mantidas em sala climatizada (21°C e 60% U.R.) até a semeadura. Uma amostra de 16 gramas de sementes/variedade foi semeada em caixas plásticas conforme descrito por Santos (2011). Cerca de 40 dias após a semeadura foi avaliado o número de plantas desenvolvidas a partir dos cruzamentos gerados. Quando os cruzamentos geraram menos de 16 gramas, o total de sementes produzidas foi semeado. No total, foram realizados 62 cruzamentos, com 17 genitores masculinos em 2012, 25 em 2013 e 20 em 2014. Cinquenta e cinco cruzamentos foram do tipo biparental e sete envolveram múltiplos genitores masculinos (variando de dois a 12 genótipos) (Tabela 1). Ao todo, foram utilizados como machos 60 genótipos e como fêmeas 40 genótipos. Os cruzamentos em 2012 e 2013 envolveram variedades comerciais do programa de RIDESA e de outras instituições de pesquisa. Em 2014, todos os genitores masculinos foram de *S. spontaneum* (Tabela 1).

Tabela 1. Relação de cruzamentos, genitores, épocas de florescimento dos genitores, quantidade de sementes e de plantas de cana-de-açúcar obtidas na Estação de Floração e Cruzamentos de Serra do Ouro (EFCO, Murici-AL) entre os anos de 2012 e 2014.

Ano	Cruzamento	Genitor feminino	Florescimento ¹	Genitor masculino ²	Florescimento	Peso sementes (g)	Nº Plantas ³
2012	1	SP76-4092	I	BH1012	I	26,0	163
2012	2	RB966927	I	F150	P	17,0	4
2012	3	RB952675	I	IAC862210	P	45,0	110
2012	4	RB966927	I	MEX5217	I	10,0	81
2012	5	RB911225	I	NCO 310	I	29,0	701
2012	6	RB92606	I	NCO 310	I	31,0	472
2012	7	RB925345	I	RB01478	P	25,0	3
2012	8	RB00410	I	RB040816	I	26,0	56
2012	9	RB943161	I	RB04815	P	60,0	34
2012	10	RB966922	I	RB845222	P	30,0	14
2012	11	RB941531	I	RB845323	P	40,0	10
2012	12	RB00410	I	RB945954	I	11,0	33
2012	13	VAT90186	I	RB945954	I	49,0	496
2012	14	RB915141	I	RB96502	P	47,0	7
2012	15	SP891115	I	MP1	P	30,0	526
2012	16	SP76-4092	I	TCP863369	I	24,0	160

Continua...

Tabela 1. Continuação.

Ano	Cruzamento	Genitor feminino	Florescimento ¹	Genitor masculino ²	Florescimento	Peso sementes (g)	Nº Plantas ³
2012	17*	RB915146	I	US851008	I	63,5	10
2013	18	RB965902	I	F150	P	24,0	0
2013	19	RB925345	I	F150	P	35,0	0
2013	20	VAT90186	I	IAC862210	P	28,4	18
2013	21	RB04816	I	MP 2	P	30,0	0
2013	22	RB04810	P	MP 3	P	11,0	264
2013	23	RB92579	I	MP 4	I	60,0	0
2013	24*	RB04813	I	MP 5	P	17,0	11
2013	25*	RB966928	I	MP 5	P	10,0	253
2013	26*	RB93509	I	MP 6	P	37,0	23
2013	27	RB04801	I	MP 7	P	26,0	10
2013	28	RB92606	I	NCO 310	I	29,0	0
2013	29	RB912525	I	NCO 310	I	24,0	43
2013	30	RB92606	I	NCO 310	I	30,0	36
2013	31	RB965902	I	RB72910	P	35,0	0
2013	32	RB965902	I	RB72910	P	31,0	20
2013	33	RB966922	I	RB845222	P	63,5	552
2013	34	RB99395	I	RB845222	P	25,0	0

Continua...

Tabela 1. Continuação.

Ano	Cruzamento	Genitor feminino	Florescimento ¹	Genitor masculino ²	Florescimento	Peso sementes (g)	Nº Plantas ³
2013	35	RB966922	I	RB845222	P	49,0	0
2013	36	RB966922	I	RB845222	P	45,0	5
2013	37	RB99395	I	RB845222	P	26,0	0
2013	38	RB941531	I	RB845323	P	20,0	0
2013	39	RB946022	I	RB92579	I	25,0	0
2013	40	VAT90186	I	RB945954	P	47,0	1104
2013	41	B59136	I	RB945954	P	29,0	10
2013	42 *	RB915146	I	US851008	P	40,0	550
2014	43 *	B70710	P	IN84-82	P	42,5	ns
2014	44 *	RB324-A4	P	IN84-82	P	30,0	ns
2014	45 *	CTC22	P	IN84-82	P	52,0	ns
2014	46 *	RB961003	P	IN84-82	P	52,0	ns
2014	47 *	RB931003	P	IN84-82	P	37,0	ns
2014	48 *	RB04807	P	IJ76-293	P	56,5	ns
2014	49 *	B70710	P	IN84-58	P	68,0	ns
2014	50 *	RB93509	P	IN84-58	P	65,0	ns
2014	51 *	CTC18	P	IN84-58	P	30,0	ns
2014	52 *	RB72454	P	IN84-58	P	59,0	ns

Continua...

Tabela 1. Continuação.

Ano	Cruzamento	Genitor feminino	Florescimento ¹	Genitor masculino ²	Florescimento	Peso sementes (g)	Nº Plantas ³
2014	53 *	SP70-1143	P	IN84-58	P	25,0	ns
2014	54 *	RB863129	P	IN84-58	P	39,0	ns
2014	55 *	B70710	P	KRAKATAU	P	38,0	ns
2014	56 *	RB93509	P	KRAKATAU	P	25,8	ns
2014	57 *	RB72454	P	KRAKATAU	P	19,0	ns
2014	58 *	RB961003	P	KRAKATAU	P	49,0	ns
2014	59 *	RB04811	P	KRAKATAU	P	58,7	ns
2014	60 *	RB931003	P	KRAKATAU	P	30,5	ns
2014	61 *	RB83102	P	KRAKATAU	P	37,6	ns
2014	62 *	CP73-1547	P	KRAKATAU	P	52,0	ns
Total						2.227,0	5.779

*Cruzamentos interespecíficos com *S. spontaneum*.¹ P – precoce: florescimento de março a abril; I – Intermediário: florescimento de maio a junho;² MP- multiparental: MP1 - SP923285, RB96502; MP2 - RB918692, RB925276, RB951514, ROC5, TCP863369, TUC746, CB44160 e SP71799; MP3 - Q135, RB735275, RB815606 e CP3834; MP4 - 12 Acessos RIDEA da série RB04; MP5 - IN8258, IJ76-318, US851008, IJ76293, IN8458, IM76-229 e IM76-228; MP6 - IM76-229, IN84-82, IN84-58 e IJ76-318; MP7 - RB845222 e F150;³ Número de plântulas obtidas a partir da semeadura de 16 gramas de sementes. ns - não semeadas.

Resultados

A viabilidade polínica apresentou valores satisfatórios nas estimativas dos parâmetros integridade e germinação in vitro, com valores médios de 71,62% e 16,80% respectivamente, na média de três anos 2012, 2013 e 2014 (Tabelas 2, 3 e 4).

Tabela 2. Integridade celular do grão-de-pólen em variedades de cana-de-açúcar e espécies do Complexo *Saccharum* spp. durante os anos de 2012-2014 na EFCO/RIDES-UFAL, AL.

Variedades	Espécies	Anos			Média
		2012	2013	2014	
F 150	<i>Saccharum</i> sp.	62,16	82,27		72,22
IAC 862210	<i>Saccharum</i> sp.	68,58	92,19		80,39
MEX 5217	<i>Saccharum</i> sp.	61,36			61,36
NCO 310	<i>Saccharum</i> sp.	68,87	76,04		72,46
RB 01478	<i>Saccharum</i> sp.	76,54			76,54
RB 04816	<i>Saccharum</i> sp.	70,23	74,21	47,45	63,96
RB 72454	<i>Saccharum</i> sp.		66,47		66,47
RB 72910	<i>Saccharum</i> sp.	93,54	85,54		89,54
RB 845222	<i>Saccharum</i> sp.	84,68	84,49	65,15	78,11
RB 845323	<i>Saccharum</i> sp.	83,36	87,81		85,59
RB 867515	<i>Saccharum</i> sp.		50,47	27,69	39,08
RB 92579	<i>Saccharum</i> sp.		89,90	67,92	78,91
RB 945954	<i>Saccharum</i> sp.	64,84	75,99		70,42
RB 96502	<i>Saccharum</i> sp.	74,14			74,14
SP 813250	<i>Saccharum</i> sp.		68,97	39,80	54,39
SP 923285	<i>Saccharum</i> sp.	54,80			54,80
TCP 863369	<i>Saccharum</i> sp.	82,37			82,37
IJ 76293	<i>S. spontaneum</i>		94,89	93,48	94,19
IM 76228	<i>S. spontaneum</i>		96,92	92,86	94,89
IM 76229	<i>S. spontaneum</i>		94,05	96,49	95,27

Continua...

Tabela 2. Continuação.

Variedades	Espécies	Anos			Média
		2012	2013	2014	
IN 8458	<i>S. spontaneum</i>		97,30	81,81	89,56
IN 8482	<i>S. spontaneum</i>			92,19	92,19
KRAKATAU	<i>S. spontaneum</i>			90,54	90,54
US 851008	<i>S. spontaneum</i>	62,21	75,41	52,25	63,29
CREOULA	<i>S. officinarum</i>			53,40	53,40
CTC 8	<i>S. officinarum</i>			60,98	60,98
IS 76155	<i>S. officinarum</i>			56,94	56,94
MALI	<i>S. officinarum</i>			42,02	42,02
NG 57221	<i>S. officinarum</i>			24,40	24,40
S OFF. 8280	<i>S. officinarum</i>			11,58	11,58
Máximo		93,54	97,30	96,49	95,27
Mínimo		54,80	50,47	11,58	11,58
Média Geral		71,98	81,94	60,94	69,00
Desvio padrão		10,97	12,67	26,24	20,86

Tabela 3. Germinação in vitro do pólen em variedades e espécies do Complexo *Saccharum* spp. durante os anos de 2012-2014 na EFCSO/RIDES-UFAL, AL.

Variedade	Espécies	Anos			Média
		2012	2013	2014	
F 150	<i>Saccharum</i> sp.	20,65	8,21		14,43
IAC 862210	<i>Saccharum</i> sp.	15,04	4,23		9,64
MEX 5217	<i>Saccharum</i> sp.	28,58			28,58
NCO 310	<i>Saccharum</i> sp.	26,70	25,46		26,08
RB 01478	<i>Saccharum</i> sp.	10,74	7,57		9,16
RB 04816	<i>Saccharum</i> sp.	24,58	11,51	7,30	14,46
RB 72454	<i>Saccharum</i> sp.		8,75		8,75
RB 72910	<i>Saccharum</i> sp.	10,98	25,46		18,22

Continua...

Tabela 3. Continuação.

Variedade	Espécies	Anos			Média
		2012	2013	2014	
RB 845222	<i>Saccharum</i> sp.	20,80	7,51	13,64	13,98
RB 845323	<i>Saccharum</i> sp.	51,85	6,37		29,11
RB 867515	<i>Saccharum</i> sp.		12,32	3,44	7,88
RB 92579	<i>Saccharum</i> sp.		9,43	7,54	8,49
RB 945954	<i>Saccharum</i> sp.	44,38	11,51		27,95
RB 96502	<i>Saccharum</i> sp.	31,92	21,26		26,59
SP 813250	<i>Saccharum</i> sp.		7,24	6,17	6,71
SP 923285	<i>Saccharum</i> sp.	7,45			7,45
TCP 863369	<i>Saccharum</i> sp.	15,39			15,39
IJ 76293	<i>S. spontaneum</i>		7,95	31,52	19,74
IM 76228	<i>S. spontaneum</i>		3,08	39,29	21,19
IM 76229	<i>S. spontaneum</i>		5,68	30,70	18,19
IN 8458	<i>S. spontaneum</i>		11,89	54,54	33,22
IN 8482	<i>S. spontaneum</i>			35,94	35,94
KRAKATAU	<i>S. spontaneum</i>			5,41	5,41
US 851008	<i>S. spontaneum</i>	8,74	12,84	4,70	8,76
CREOULA	<i>S. officinarum</i>			6,80	6,80
CTC 8	<i>S. officinarum</i>			32,92	32,92
IS 76155	<i>S. officinarum</i>			13,89	13,89
MALI	<i>S. officinarum</i>			5,80	5,80
NG 57221	<i>S. officinarum</i>			1,19	1,19
S OFF. 8280	<i>S. officinarum</i>			1,22	1,22
Máximo		51,85	25,46	54,54	35,94
Mínimo		7,45	3,08	1,19	1,19
Média Geral		22,70	10,96	16,78	15,90
Desvio padrão		13,26	6,46	16,15	10,08

Tabela 4. Estatística descritiva para as avaliações de integridade celular e germinação in vitro do pólen em genótipos do Complexo *Saccharum* spp.

Parâmetros	Integridade			Germinação		
	2012	2013	2014	2012	2013	2014
Média geral	71,98	81,94	60,94	22,70	10,96	16,78
Variância	120,32	160,48	688,74	175,89	41,71	260,92
Desvio padrão	10,97	12,67	26,24	13,26	6,46	16,15
Amplitude	38,74	46,83	84,91	44,40	22,38	53,35
Erro padrão da média	3,04	2,99	6,37	3,68	1,52	3,92
Coefic. variação (%)	15,24	15,46	43,06	58,43	58,92	96,27
<i>Saccharum</i> spp.						
Média	72,73	77,86	49,60	23,77	11,92	7,62
Variância	121,78	140,98	289,53	173,06	48,82	13,98
Desvio padrão	11,04	11,87	17,02	13,16	6,99	3,74
Amplitude	38,74	41,72	40,23	44,40	21,23	10,20
Erro padrão da média	3,19	3,29	8,51	3,80	1,94	1,87
Coefic. variação (%)	15,17	15,25	34,30	55,34	58,63	49,08
<i>S. spontaneum</i>						
Média	62,21	91,71	85,66	8,74	8,29	28,87
Variância		84,92	237,96		16,93	327,07
Desvio padrão		9,22	15,43		4,12	18,09
Amplitude		21,89	44,24		9,76	49,84
Erro padrão da média		4,61	15,43		2,06	18,09
Coefic. variação (%)		10,05	18,01		49,65	62,64

Continua...

Tabela 4. Continuação.

Parâmetros	Integridade			Germinação		
	2012	2013	2014	2012	2013	2014
<i>S. officinarum</i>						
Média			41,55			10,30
Variância			389,47			144,50
Desvio padrão			19,73			12,02
Amplitude			49,40			31,73
Erro padrão da média			8,83			5,38
Coefic. variação (%)			75,20			74,42

Quando comparada a viabilidade polínica das espécies do Complexo *Saccharum* spp. é possível verificar que *S. spontaneum* apresentou superioridade na média dos parâmetros integridade (85,66%) e germinação (28,87%), superando as variedades comerciais (49,60% e 7,62%) e canas doces (41,55% e 10,30%) durante o ano de 2014 (Tabela 4). O destaque de *S. spontaneum* na viabilidade polínica está em consonância com a descrição de maior vigor vegetativo e reprodutivo, além da grande rusticidade das plantas, sendo consideradas as mais selvagens do Complexo *Saccharum* spp. (SINGH et al., 2010).

A viabilidade polínica de *S. spontaneum* confirmou a fertilidade masculina e serviu de indicativo de êxito em cruzamentos. Neste sentido, todos os cruzamentos interespecíficos foram efetivos com *S. spontaneum* (cruzamentos 17, 24-26 e 42) porque possibilitaram a obtenção de 857 plantas. Esse número de plantas poderá ser ainda maior quando o restante das sementes (866,6g dos cruzamentos 43-62) for colocado para germinar (Tabela 1). O êxito nos cruzamentos interespecíficos com *S. spontaneum* abre perspectiva ao desenvolvimento da “cana energia”, que é demanda atual do setor produtivo. A expectativa de que *S. spontaneum* contribua para

o desenvolvimento de variedades para “cana energia” se deve às características de alta produtividade, boa capacidade de perfilhamento, maior resistência a patógenos e pragas, maior capacidade de rebrota após cortes sucessivos e alta porcentagem de fibra (CARVALHO-NETTO et al., 2014).

Apesar da importância dos parâmetros de viabilidade polínica na escolha dos genitores masculinos em cruzamentos artificiais, fica evidente que existem outros fatores influenciando a formação de sementes. Em 2012, os cruzamentos 5, 6, 13 e 15, com maior quantidade de plântulas foram também aqueles que apresentavam a taxa de germinação in vitro superior à média. Por outro lado, também foram observadas algumas inconsistências, como por exemplo, para os cruzamentos 11 e 12, com poucas plântulas, apesar da germinação do pólen elevada, em torno de 50%. Em 2013, os cruzamentos utilizando a variedade RB 845222 (com germinação de 7,51%) foram em geral ineficientes, à exceção daquele realizado utilizando como genitor feminino a variedade RB 966922, que produziu 552 plântulas. Da mesma forma, NCO 310 (com germinação de 25,46%) gerou plântulas em dois dos três cruzamentos, mas o número obtido foi baixo (Tabela 3).

Além da viabilidade polínica, outros fatores também podem influenciar a formação das sementes e que não foram considerados neste estudo. Segundo Cabral et al. (2011) e AMARAL et al. (2012), que realizaram estudos no mesmo ambiente da presente pesquisa e com o objetivo comum de realizar cruzamentos artificiais, os fatores que podem influenciar a formação de sementes de cana-de-açúcar são: (a) causas genéticas, onde a incompatibilidade entre os genitores em cruzamento resulta em interações negativas entre o pólen e o pistilo, resultando em falhas no desenvolvimento do embrião; (b) causas ambientais, onde temperaturas extremas para o florescimento da cana-de-açúcar (acima de 32°C e abaixo de 18°) associadas ou não a baixa umidade relativa do ar podem determinar na morte do pólen e inviabilidade das flores; (c) manipulações excessivas das inflorescências podem prejudicar

a polinização e a realização de cruzamentos, causando a redução na produção de sementes. Além disso, o potencial de produção de espiguetas férteis e o potencial fisiológico de sementes de cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.) podem apresentar variações em função do tipo de cruzamento e entre hibridações realizadas em diferentes anos.

Como resultados dos cruzamentos realizados foi produzido um total de 2.227 gramas de sementes. Em média, cada cruzamento produziu 35,9 gramas de sementes. A média de sementes por cruzamento dentro de cada ano foi de 33,1 g, 31,9 g e 43,3 g para 2012, 2013 e 2014, respectivamente. Observa-se um aumento na quantidade média de sementes para o ano de 2014 (Tabela 1) que pode ser explicada pelo uso da espécie *S. spontaneum* como genitor masculino, com alto vigor e maiores taxas de germinação do pólen. Além disso, também pode existir influencia do tamanho das panículas dos parentais femininos (sete genótipos foram coincidentes entre os anos de 2012 e 2013, mas nenhum dos demais 14 genitores de 2014 foi utilizado em anos anteriores). Ainda como resultado dos cruzamentos, um total de 5.779 plantas foram obtidas. Em média, para cada amostra de 16 gramas de sementes foram obtidas 138 plantas (Tabela 1). Em 2012 e 2013 esse valor foi de 169 e 116 plantas. Todos os cruzamentos de 2012 geraram plantas, enquanto para 2013 a maioria destas foi proveniente dos cruzamentos 33, 40 e 42, sendo que em 11 dos 25 cruzamentos não houve germinação de sementes. Como os cruzamentos são diferentes a cada ano, não é possível comparar nem inferir sobre as causas da falha na produção de sementes e plantas.

Conclusão

A viabilidade polínica dos genótipos foi satisfatória para a realização de cruzamentos intra e interespecíficos do Complexo *Saccharum* spp., sendo possível a obtenção de diversas plantas nas condições da Serra do Ouro, Murici, AL.

Agradecimentos

À Embrapa e a RIDESA pelo suporte financeiro.

Ao engenheiro-agrônomo Diógenes dos Anjos de Medeiros da UEP Rio Largo, Embrapa Tabuleiros Costeiros.

Ao técnico em agropecuária Edimundo Leobino Silva e aos Funcionários da Estação de Floração e Cruzamentos da Serra do Ouro/RIDESA-AL.

Referências

AMARAL A. L.; SANTOS J. M.; CAMARA T. M. M., BARBOSA, G. V. S. **Metodologia de conservação de pólen de cana-de-açúcar**. Aracaju, SE: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2012. 11 p. (Embrapa Tabuleiros Costeiros. Comunicado Técnico, 127).

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

CARVALHO-NETTO, O. V.; BRESSIANI, J. A.; SORIANO, H. L.; FIORI, C. S.; SANTOS, J. M.; BARBOSA, G. V. S.; XAVIER, M. A.; LANDELL, M. G. A.; PEREIRA, G. A. G. The potential of the energy cane as the main biomass crop for the cellulosic industry. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**, v. 1, n. 1, p. 1-20, 2014.

CESNIK, R.; MIOCQUE, J. **Melhoramento da cana-de-açúcar**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2004. 307 p.

CRESTE, S.; PINTO, L.R.; MARCOS, M.A.X.; LANDELL, G.A. Importância do germoplasma no desenvolvimento de cultivares de cana-de-açúcar com perfil agroenergético. In: CORTEZ, L.A.B. **Bioetanol de cana-de-açúcar – P&D para produtividade e sustentabilidade**. Paulo: Blucher, 2010, p. 353-358. 954 p.

HENRY, R.J.; KOLE, C. **Genetics, genomics and breeding of sugarcane**. Enfield: Science Publishers, 2010. 272 p.

KRISHNAMURTHI, M. The sugarcane pollen. In: INTERNATIONAL SOCIETY OF SUGAR CANE TECHNOLOGISTS CONGRESS, 16., 1997, São Paulo. **Proceedings...** São Paulo: ISSCT, p. 157-164, 1997.

MACHADO JÚNIOR, G. R.; WALKER, D. I.; BRESSIANI, J. A.; SILVA, G. J. A. Emasculation of sugarcane tassels using hot water. In: INTERNATIONAL SOCIETY OF SUGAR CANE TECHNOLOGISTS CONGRESS, 22., 1996, Cartagena. **Proceedings...** Cartagena, 1996. Disponível em: <<http://www.issct.org/pdf/proceedings/1995/1996%20Machado%20Emasculation%20of%20Sugarcane%20Tassels%20Using%20Hot%20Water.pdf>>. Acesso em: 14 set. 2014.

MARY, S.; NAIR, N. V.; CHATURVEDI, P. K.; SELVI, A. Analysis of genetic diversity among *Saccharum spontaneum* L. from four geographical regions of India, using molecular markers. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 53, p. 1221-1231, 2006.

PAN, Y. B.; BURNER, D. M.; LEGENDRE, B. L.; GRISHAM, M. P.; WHITE, W. H. An assessment of the genetic diversity within a collection of *Saccharum spontaneum* L. with RAPD-PCR. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 51, p. 895-903, 2004.

SANTOS, A. F. **Avaliação de famílias na seleção de indivíduos de cana-de-açúcar submetidos a ambiente adensado e controlado**. 2011. 44 f. Monografia. (Engenheiro_agrônomo) - Universidade Federal de Alagoas, Rio Largo.

SINGH, R. K.; MISHRA, S. K.; SINGH, S. P.; MISHRA, N.; SHARMA, M. L. Evaluation of microsatellite markers for genetic diversity analysis among sugarcane species and commercial hybrids. **Australian Journal of Crop Science**, v. 4, n. 2, p. 116-125, 2010.



Tabuleiros Costeiros

Ministério da
**Agricultura, Pecuária
e Abastecimento**

