



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
CURSO DE BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

SOFIA SOARES DE FIGUEIREDO

**AVALIAÇÃO DA FIDELIDADE GENÉTICA DE CANA DE AÇÚCAR OBTIDA POR
MICROPROPAGAÇÃO EM BIORREACTORES DE IMERSÃO TEMPORÁRIA
UTILIZANDO MARCADORES MOLECULARES E BIOQUÍMICOS**

RECIFE

2024

SOFIA SOARES DE FIGUEIREDO

**AVALIAÇÃO DA FIDELIDADE GENÉTICA DE CANA DE AÇÚCAR OBTIDA POR
MICROPROPAGAÇÃO EM SISTEMA DE IMERSÃO TEMPORÁRIA
UTILIZANDO MARCADORES MOLECULARES E BIOQUÍMICOS**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação em
Ciências Biológicas da Universidade
Federal de Pernambuco, como requisito
parcial para obtenção do título de Bacharel
em Ciências Biológicas.

Orientador (a): Dra Fabiana Aparecida Cavalcante Silva

Coorientador (a): Dr Elton Pedro Nunes Pena

Recife

2024

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Figueiredo, Sofia Soares de .

Avaliação da fidelidade genética de cana de açúcar obtida por micropropagação em biorreatores de imersão temporária utilizando marcadores moleculares e bioquímicos / Sofia Soares de Figueiredo. - Recife, 2024.

81 p. : il., tab.

Orientador(a): Fabiana Aparecida Cavalcante Silva

Coorientador(a): Elton Pedro Nunes Pena

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Ciências Biológicas - Bacharelado, 2024.

Inclui referências, anexos.

1. DNA. 2. Marcador molecular. 3. Variação somaclonal. I. Silva, Fabiana Aparecida Cavalcante. (Orientação). II. Pena, Elton Pedro Nunes. (Coorientação).
IV. Título.

570 CDD (22.ed.)

**AVALIAÇÃO DA FIDELIDADE GENÉTICA DE CANA DE AÇÚCAR OBTIDA POR
MICROPROPAGAÇÃO EM SISTEMA DE IMERSÃO TEMPORÁRIA
UTILIZANDO MARCADORES MOLECULARES E BIOQUÍMICOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Aprovado em: 04/03/2024

BANCA EXAMINADORA

Dra. Fabiana Aparecida Cavalcante Silva (Orientadora)
Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste- CETENE

Prof. Dra. Andrea Pedrosa Harand (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Carolina Elstein (Examinador Externo)
Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste- CETENE

AGRADECIMENTOS

À Deus, por sempre estar presente nos momentos mais difíceis e por me conceder forças.

Aos meus pais, Hugo e Rosemere, por serem meu porto seguro, por todo amor, incentivo e por nunca medirem esforços para me verem bem.

Agradeço à minha orientadora Dra. Fabiana Aparecida Cavalcante Silva por todos os ensinamentos, pelo incentivo, amizade, paciência e pelo total apoio no desenvolvimento deste trabalho, contribuindo de forma incontestável para minha capacitação profissional.

Ao meu coorientador Dr Elton Pena pelo apoio, ensinamentos e pelas colaborações valiosas para a conclusão deste trabalho.

Agradeço à Msc. Rayssa Guedes por toda paciência, amizade e por ter me ensinado a executar partes deste trabalho.

Agradeço aos amigos dos LADIF (Laboratório de Diagnose Fitossanitária e Fidelidade Genética), Dra Bianca, Greecy, Carolina, Paloma pelo aprendizado diário e momentos de descontração;

Agradeço a todos do CETENE por me acolherem, pelos momentos de risadas e conversas e que, de alguma forma, colaboraram direta ou indiretamente na execução deste trabalho. Agradeço aos amigos dos LABIO (Laboratório de Bioprocessos), Rafael, Aline, Yrlânia e Flávia pelo suporte nos momentos de dificuldade e ensinamentos. Em especial agradeço a Isaac por toda ajuda, disponibilidade e alegria compartilhada diariamente.

Aos funcionários da Biofábrica Governador Miguel Arraes, Wilma, Gilson, Leandro, Bruno, e especialmente Pauliana, Débora, Gilmar, Thaiza, Diógenes e Dr James por todo apoio, atenção, disponibilidade e ensinamentos. Sou grata por me receberam e me ajudarem nessa caminhada.

Agradeço a minha amiga Marilia Alves, por toda amizade, companheirismo e por sempre me escutar e levantar minha autoestima.

Enfim, a todos que direta ou indiretamente contribuíram para o meu desenvolvimento durante a graduação e também por fazerem parte de minha vida. Muito obrigada!

“A única forma de chegar ao impossível é acreditar que é possível”

(Lewis Carroll, Alice no País das Maravilhas).

RESUMO

A cana-de-açúcar é uma cultura amplamente cultivada, em virtude da sua importância para o agronegócio brasileiro. Nesse sentido, a micropropagação tem sido utilizada na produção em larga-escala para obtenção de clones de alta qualidade, entretanto, tal tecnologia pode induzir a ocorrência de variações somaclonais. O presente estudo tem como objetivo utilizar marcadores moleculares baseados em DNA, o ISSR (Inter-Simple Sequence Repeat) e o SCoT (Start códon targeted), para avaliar a possível ocorrência de variações somaclonais em plântulas de cana-de-açúcar (var. RB041443 e RB92579) durante a micropropagação utilizando biorreatores de imersão temporária (BIT). O DNA genômico foliar das plantas matrizes, clones de cana-de-açúcar (Subcultivos 1 a 5) e BIT, foram extraídos e dispostos em reações em cadeia da polimerase utilizando 38 primers ISSR e 38 SCoT. Os géis foram analisados visualmente a partir de uma matriz de dados binários correspondente à presença (1) ou ausência (0) das bandas geradas na amplificação, por conseguinte foi feito um dendrograma de dissimilaridade genética estimada pelo índice de Jaccard entre as amostras, através do método de agrupamento Neighbor-Joining. Para a variedade RB041443 foram selecionados os primers que geraram amplicons, sendo escolhidos 20 ISSR que geraram um total de 168 bandas, sendo 82 polimórficas e 86 monomórficas, além de 11 primers SCoT que geraram um total de 84 bandas, sendo 22 fragmentos polimórficos e 62 monomórficos. Para a var. RB92579, foram selecionados 13 primers ISSR amplificando um total de 86 bandas, sendo 36 fragmentos polimórficos e 50 monomórficos, além de 16 primers SCoT que produziram 130 bandas, sendo 20 fragmentos polimórficos enquanto 110 foram monomórficos. Os dendrogramas revelaram baixo nível de dissimilaridade genética e os marcadores ISSR e SCoT selecionados foram eficientes em determinar o *fingerprinting* das variedades de cana-de-açúcar (var. RB92579 e RB1041443). No entanto para a variedade RB92579 estudos complementares se mostraram necessários a fim de aplicar análises estatísticas aprofundadas para determinar possíveis diferenças genéticas entre os clusters formados. As avaliações da resposta bioquímica (Dosagem de proteínas, teor de pigmentos fotossintetizantes e teor de MDA), foram observadas alterações significativas nos subcultivos 1 da var. RB92579 e no subcultivo 3 da var. RB041443 indicando que tais etapas requerem maior atenção durante o processo de micropropagação, porém não influenciam nas etapas subsequentes e não induzem variação somaclonal.

Palavras-chave: DNA, Marcador molecular, Variação somaclonal.

ABSTRACT

Sugarcane is a widely cultivated crop, due to its importance for Brazilian agribusiness. In this sense, micropropagation has been used in large-scale production to obtain high-quality clones, however, such technology can induce the occurrence of somaclonal variations. The present study aims to use DNA-based molecular markers, ISSR (Inter-Simple Sequence Repeat) and SCoT (Start codon targeted), to evaluate the possible occurrence of somaclonal variations in sugarcane seedlings (var. RB041443 and RB92579) during micropropagation using temporary immersion bioreactors (BIT). Leaf genomic DNA from parent plants, sugarcane clones (Subcultures 1 to 5) and BIT, were extracted and arranged in polymerase chain reactions using 38 ISSR and 38 SCoT primers. The gels were visually analyzed from a matrix of binary data corresponding to the presence (1) or absence (0) of the bands generated in the amplification, therefore a dendrogram of genetic dissimilarity estimated by the Jaccard index between the samples was made, through the Neighbor-Joining grouping method. For the RB041443 variety, the primers that generated amplicons were selected, with 20 ISSR being chosen, which generated a total of 168 bands, 82 of which were polymorphic and 86 monomorphic, in addition to 11 SCoT primers that generated a total of 84 bands, of which 22 were polymorphic fragments and 62 monomorphic. For var. RB92579, 13 ISSR primers were selected, amplifying a total of 86 bands, 36 of which were polymorphic fragments and 50 were monomorphic, in addition to 16 SCoT primers that produced 130 bands, 20 of which were polymorphic fragments while 110 were monomorphic. The dendrograms revealed a low level of genetic dissimilarity and the selected ISSR and SCoT markers were efficient in determining the fingerprinting of sugarcane varieties (vars. RB92579 and RB1041443). However, for the RB92579 variety, additional studies were necessary in order to apply in-depth statistical analyzes to determine possible genetic differences between the clusters formed. In the evaluations of the biochemical response (Protein dosage, photosynthetic pigment content and MDA content), significant changes were observed in subcultures 1 of var. RB92579 and in subcultivation 3 of var. RB041443 indicating that such steps require greater attention during the micropropagation process, but do not influence subsequent steps and do not induce somaclonal variation.

Keywords: DNA, Molecular marker, Somaclonal variation.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Características das variedades RB041443 e RB92579.	19
Tabela 2 –	Quantificação do DNA genômico, em triplicata, da variedade RB041443 de cana-de-açúcar extraída pelo método automatizado Extracta® 16(Loccus Biotecnologia®). 1. Matriz; 2. Subcultivo 1; 3. Subcultivo 2; 4. Subcultivo 3; 5. Subcultivo 4; 6. Subcultivo 5; 7. Clones introduzidos no sistema de biorreator de imersão temporária (BIT).	42
Tabela 3 –	Quantificação do DNA genômico, em triplicata, da variedade RB92579 de cana-de-açúcar extraída pelo método CTAB modificado. 1. Matriz; 2. Subcultivo 1; 3. Subcultivo 2; 4. Subcultivo 3; 5. Subcultivo 4; 6. Subcultivo 5; 7. Clones introduzidos no sistema de biorreator de imersão temporária (BIT).	42
Tabela 4 –	Oligonucleotídeos do tipo UBC ISSR usados para amplificação do DNA foliar de cana-de-açúcar (variedade RB041443). Ta = temperatura de anelamento. R = (A, G), V = (A, C, G) e Y = (C, T).	44
Tabela 5 –	Oligonucleotídeos do tipo UBC ISSR usados para amplificação do DNA foliar de cana-de-açúcar (variedade RB92579). Ta = temperatura de anelamento. R = (A, G), V = (A, C, G) e Y = (C, T).	46
Tabela 6 –	Oligonucleotídeos do tipo SCoT usados para amplificação do DNA foliar de cana-de-açúcar (variedade RB041443). Ta = temperatura de anelamento. R = (A, G), V = (A, C, G) e Y = (C, T).	50
Tabela 7 –	Oligonucleotídeos do tipo SCoT usados para amplificação do DNA foliar de cana-de-açúcar (variedade RB92579). Ta = temperatura de anelamento. R = (A, G), V = (A, C, G) e Y = (C, T).	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BIT – Biorreator de imersão temporária

DNA – Ácido desoxirribonucleico

dNTP – Dinucleotídio trifosfato

ISSR – Sequência simples repetida interna

PCR – Reação em cadeia da polimerase

RAPD – Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso

SCoT - Start codon targeted

SSR – Repetições de sequências simples

Taq – *Thermus aquaticus*

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
2.1	Cana-de-açúcar.....	14
2.1.1	Importância econômica da cana-de-açúcar.....	16
2.1.2	Cana-de-açúcar no Brasil.....	18
2.1.3	Aplicação da propagação vegetativa na produção de cana-de-açúcar em larga escala.....	19
2.2	Micropropagação.....	20
2.2.1	Sistema de biorreator de imersão temporária (BIT).....	21
2.3	Fidelidade genética/variação somaclonal.....	23
2.4	Marcadores moleculares.....	25
3	OBJETIVOS.....	28
3.1	Geral.....	28
3.2	Específicos.....	28
4	METODOLOGIA.....	29
4.1	Coleta de material vegetal e introdução <i>in vitro</i>	29
4.2	Coleta de plântulas dos subcultivos 1 a 5 e biorreatores de imersão temporária (BIT).....	30
4.3	Extração de DNA genômico.....	30
4.3.1	Método convencional.....	30
4.3.2	Método automático baseado em beads magnéticas.....	32
4.3.3	Seleção de marcadores ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) e SCoT (Start codon targeted).....	33
4.3.4	Análises de dados.....	34
4.4	Avaliação fisiológica e bioquímica.....	34

4.4.1	Análise de pigmentos fotossintetizantes	34
4.4.2	Determinação de malondialdeído (MDA).....	35
4.4.3	Determinação de proteínas solúveis totais	35
4.4.4	Análise estatística.....	36
4.5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
4.5.1	Obtenção de material vegetal de cana-de-açúcar das variedades RB041443 e RB92579.....	37
4.5.2	Extração de DNA genômico e quantificação	40
4.5.3	Análise de fidelidade genética de cana-de-açúcar (variedades RB041443 e RB92579) utilizando marcadores ISSR	42
4.5.4	Análise de fidelidade genética de cana-de-açúcar (variedades RB041443 e RB92579) utilizando marcadores SCoT	49
4.6	Análises fisiológicas e bioquímicas.....	56
5	CONCLUSÃO.....	62
	REFERÊNCIAS	63
	ANEXOS.....	69

1 INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*), pertencente à família Poaceae, é uma monocotiledônea amplamente cultivada em escala mundial devido a sua importância econômica, sendo a principal matéria-prima para a produção de açúcar, etanol, bioeletricidade e outros compostos com alto valor agregado (MELO, 2011; CONAB, 2023). Essa cultura tem o Brasil como o maior produtor mundial decorrente de uma área cultivada de 8,3 milhões de hectares e uma exportação de 18,8 milhões de toneladas de açúcar de abril a outubro de 2023. Além disso, estimativas também apontam que a produção de açúcar ultrapassará os 46 milhões de toneladas, enquanto a produção de etanol atingirá 34 bilhões de litros (CONAB, 2023).

O alto interesse comercial no cultivo de cana de açúcar demanda uma grande quantidade de mudas com qualidade fitossanitária elevada. A micropropagação é considerada uma importante técnica, pois possibilita a obtenção de centenas e até milhares de mudas ao longo de um ano, a partir de uma única planta doadora. Entretanto um obstáculo na micropropagação é que podem ocorrer instabilidades genéticas denominadas de variações somaclonais, as quais podem interferir na multiplicação e manutenção de um determinado genótipo (MARTÍNEZ-ESTRADA, 2017).

Dessa forma, diversos marcadores moleculares têm sido amplamente utilizados na avaliação de possíveis variações somaclonais em mudas micropropagadas (GORJI et al., 2011). Entre eles, destacam-se os marcadores ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*), os quais apresentam diversas vantagens, incluindo a necessidade de pequena quantidade de DNA das amostras, rápida diferenciação entre indivíduos, elevado grau de polimorfismo, baixo custo e alta reprodutibilidade (SANTANA et al., 2011; NG; TAN, 2015). Diversos estudos têm utilizado o ISSR em análises de fidelidade genética em plantas monocotiledôneas (NASSER et al., 2024; RAMAKRISHNAN et al., 2014; ATUL et al., 2018) e dicotiledôneas (JUNG, 2021).

O marcador SCoT (*Start codon targeted*), um marcador de DNA que se baseia em regiões conservadas que flanqueiam o códon de iniciação da tradução ATG, possui um alto grau de polimorfismo, pois amplifica diferentes regiões do genoma, é um marcador molecular simples, econômico e reprodutível. São bastante utilizados em plantas comercialmente

importantes e possui diversas aplicações relacionadas à análise do genoma vegetal (RAI,2023).

Neste contexto, o presente trabalho objetivou avaliar a fidelidade genética de clones de cana-de-açúcar (var. RB041443 e RB92579) produzidos ao longo do processo (subcultivos) de micropropagação em biorreatores de imersão temporária utilizando marcadores moleculares do tipo ISSR e SCoT e, adicionalmente, inferir parâmetros fisiológicos e bioquímicos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar é uma planta monocotiledônea, nativa do sudeste asiático e pertence à família Poaceae, gênero *Saccharum* (FIGUEIREDO, 2008; CIB, 2009). As variedades comerciais dessa planta são híbridos oriundos de cruzamento entre as espécies do gênero *Saccharum*, o qual é formado por seis espécies: *S. officinarum*, *S. spontaneum*, *S. robustum*, *S. sinense*, *S. barberi* e *S. edule*, com destaque para as espécies *S. officinarum* e *S. spontaneum*, pois foram as que mais contribuíram na geração das cultivares atuais (MORAIS et al. 2015; DANIELS E ROACH, 1987; CIB, 2009). As variedades atuais de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) são híbridos poliplóides com alta variação cromossômica ($2n=100-130$), com genoma médio 19 Gb e 373,869 mil genes (SOUZA et al. 2019).

A cana de açúcar possui um metabolismo do tipo C_4 , ou seja, possui alta taxa fotossintética com alta capacidade de fixação de CO_2 , mesmo em baixas concentrações (LANGDALE, 2011), assim como melhor utilização da água e do nitrogênio (KELLOGG, 2013), conferindo assim, maior produtividade. Possui eficiência na utilização de água e é adaptada à alta intensidade térmica e de luminosidade. Suas principais características são: desenvolvimento em forma de touceira, com a formação de perfilhos; parte aérea da planta é composta por colmos; folhas completas e possuem inflorescências do tipo panícula ramificada (Figura 1) (EMBRAPA, 2012). O ciclo de desenvolvimento da cana-de-açúcar (Figura 2) é dividido em quatro fases: brotação e emergência, perfilhamento, crescimento dos colmos e maturação dos colmos (MARIN, 2022).

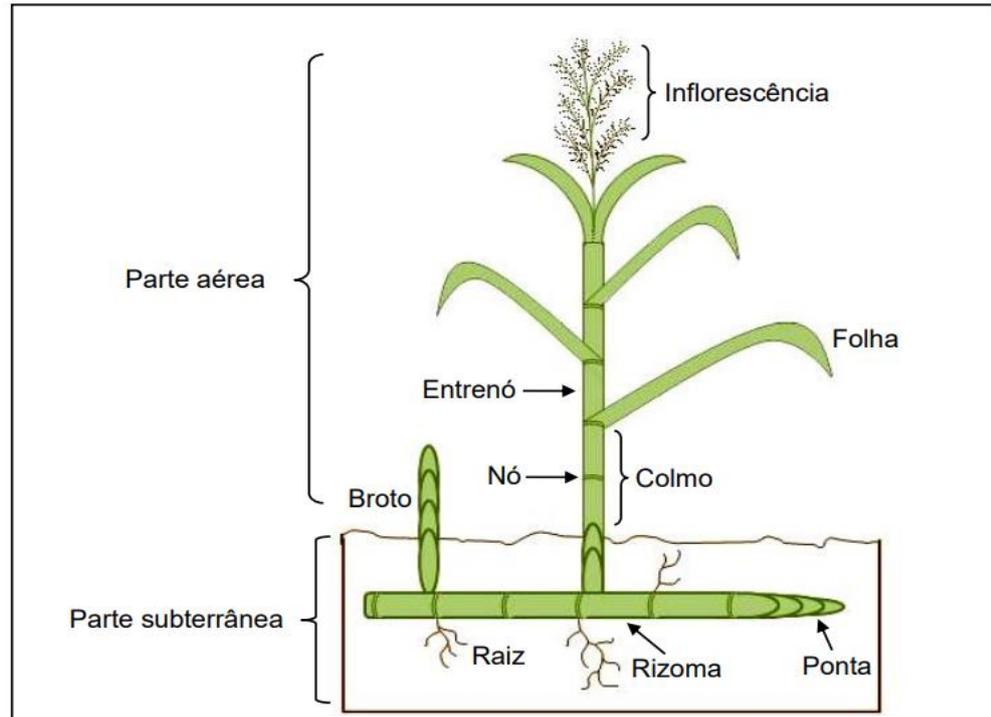


Figura 1. Morfologia do desenvolvimento da cana-de-açúcar. Fonte: Melo (2011).

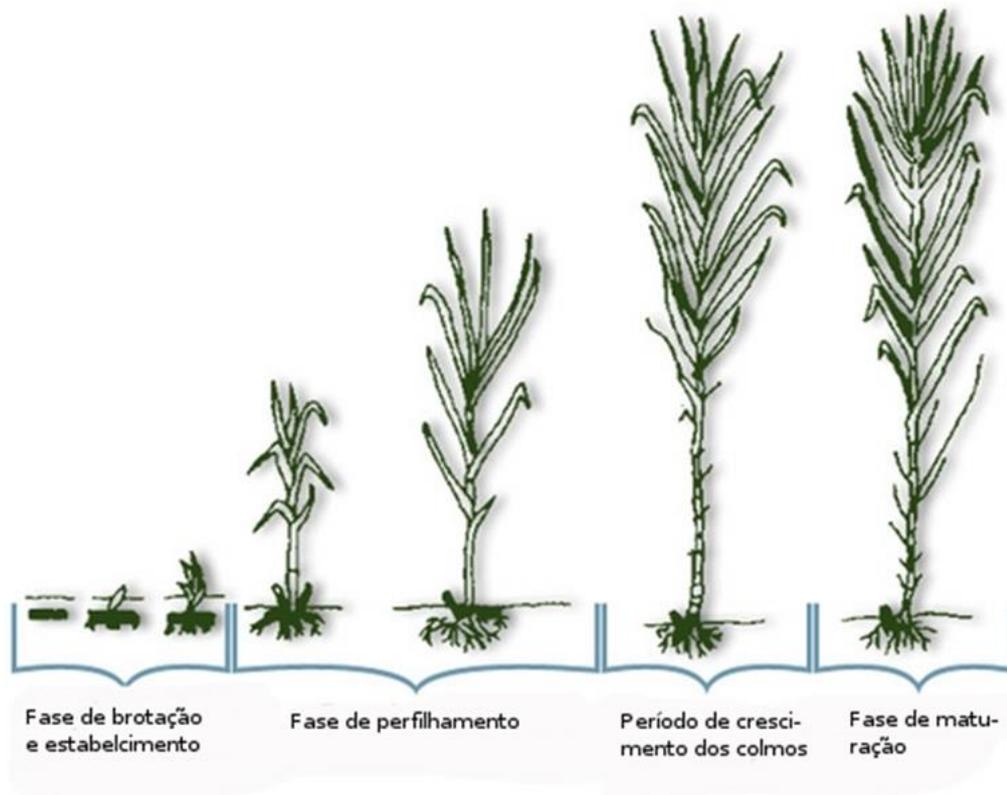


Figura 2. Fases do desenvolvimento da cana. Fonte: Gascho & Shih (1983).

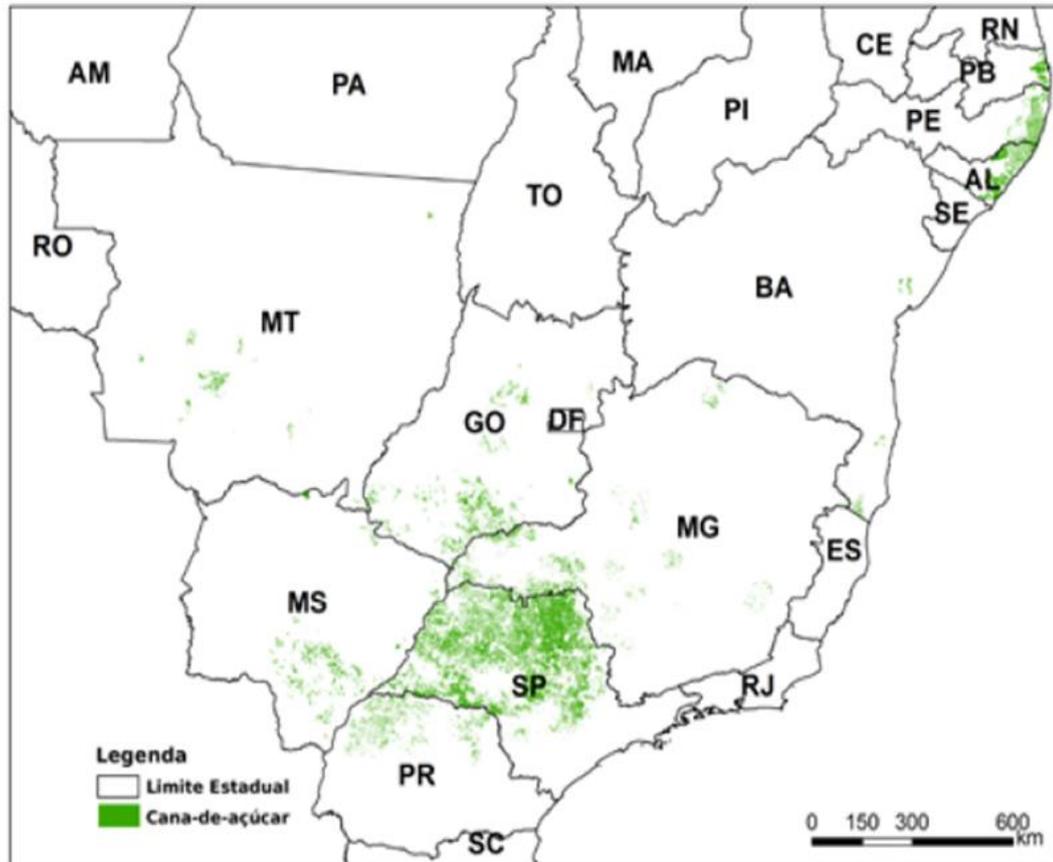


Figura 4. Mapa da distribuição geográfica das áreas de cultivo da cana-de-açúcar no Brasil. (Fonte: CONAB, 2020).

A cana-de-açúcar é bastante explorada e utilizada para diversos recursos como extração de sacarose para produção de açúcar, fonte de alimentação, produção de etanol, produção de biocombustível, sendo assim, uma cultura bastante produtiva (AZEVEDO et al., 2011; UNIÃO DA AGROINDÚSTRIA CANAVIEIRA DE SÃO PAULO, 2006).

A cadeia produtiva sucroalcooleira colabora em outros setores econômicos como no aumento da renda per capita e na geração de empregos. Além disso, faz com que haja uma redução do crescimento desordenado de pequenos centros que concentram um grande número de pessoas em um único lugar, por meio da ocupação intensiva de mão de obra rural do setor canavieiro (TETTI, 2002).

2.1.2 Cana-de-açúcar no Brasil

A cana-de-açúcar foi introduzida no Brasil por volta do século XVI e se intensificou principalmente nos estados de Pernambuco e Bahia (CESNIK; MIOCQUE, 2004). Atualmente, o Brasil é o principal produtor e exportador mundial de cana-de-açúcar apresentando uma área cultivada superior a 8,3 milhões de hectares de cana-de-açúcar, sendo estimada uma produção de aproximadamente 677 milhões de toneladas para a safra 2023/2024 (CONAB, 2023).

O Brasil possui várias regiões que possuem diferentes condições edafoclimáticas, com isso requer programas de melhoramento para que sejam produzidas variedades mais produtivas e eficientes adaptadas a cada região (MORAES et al. 2017). Atualmente, no país, atuam quatro programas de melhoramento de cana-de-açúcar: Instituto Agrônomo de Campinas- IAC; Centro de Tecnologia Canavieira – CTC; Canavialis e a Rede Interuniversitária para Desenvolvimento do Setor Sucroalcooleiro – RIDESA, que engloba sete Universidades Federais (UFPR, UFSCar, UFV, UFRRJ, UFG, UFAL e UFRPE) (BARBOSA et al., 2005).

O Programa de Melhoramento Genético da Rede Interuniversitária para Desenvolvimento do Setor Sucroenergético (RIDESA) vem contribuindo de forma significativa ao longo dos seus 49 anos para verticalização da produção da cana-de-açúcar no Brasil, onde cada nova variedade lançada atua alavancando a produção local, tornando-o mais competitivo e economicamente lucrativo. Em Pernambuco encontra-se a Biofábrica Governador Miguel Arraes, localizada no CETENE (Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste) que é uma unidade de pesquisa do Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovações (MCTI) e que tem como objetivo produzir mudas de diversas espécies vegetais de interesse econômico e social, em larga escala, para região Nordeste. Sua principal técnica é a cultura de tecidos vegetais, através da micropropagação utilizando biorreatores de imersão temporária (BIT), resultando em um material vegetal de alta qualidade fitossanitária e fidelidade genética.

A liberação de novas variedades de cana-de-açúcar é um processo lento e gradual, no qual, os clones são comparados às variedades comerciais em cada etapa de seleção, experimentação e validação, selecionando-se os melhores para cada ambiente produtivo. Neste processo de seleção são considerados parâmetros como alta produtividade, resistência a doenças e pragas, bem como tolerância ao déficit hídrico e estresse salino, fatores limitantes

na região Nordeste (OLIVEIRA, 2021). A variedade RB041443, utilizada no presente trabalho, é de grande importância para região Nordeste por possuir aptidão a colheita mecanizada, adaptabilidade e estabilidade fenotípica, tolerância a ambientes de baixa fertilidade e a solos arenosos (Tabela 1) (SOUZA, 2019). A variedade RB92579 vêm se destacando em plantios do Nordeste por proporcionar importantes ganhos na produtividade, além de apresentar características como: adaptação à diferentes ambientes, bom perfilhamento, boa brotação da soqueira, alto teor de sacarose, alta produtividade agrícola e boa adaptação à seca (Tabela 1) (OLIVEIRA et al., 2021a).

Tabela 1. Características das variedades RB041443 e RB92579. Fonte: RIDESA, 2021

Características	RB041443	RB92579
Crescimento	Rápido e ereto	Lento e semidecubente
Produtividade agrícola	Alta	Alta
Perfilhamento	Bom	Alto
Porte	Alto	Alto
Maturação	Precoce/média	Média/tardia
Teor de sacarose	Alto	Alto
Teor de fibra	Teor de fibra baixa	Teor de fibra média
Resistencia a estresses bióticos	Doença da escaldadura das folhas	Doença da escaldadura das folhas
Resistencia a estresses abióticos	Tolerante à seca	Tolerante à seca

2.1.3 Aplicação da propagação vegetativa na produção de cana-de-açúcar em larga escala

A propagação de plantas pode ser realizada a partir de dois métodos: via sementes ou através da propagação vegetativa. A propagação vegetativa pode ser realizada através de diferentes processos como enxertia, estaquia e micropropagação, onde a mesma consiste em multiplicar assexuadamente partes de plantas (células, tecidos, órgãos ou propágulos), originando indivíduos geralmente idênticos à planta-mãe. As principais vantagens da propagação vegetativa são a alta produtividade, uniformidade, qualidade e indivíduos resistentes a pragas e doenças. O grau de sucesso obtido na propagação é influenciado pela espécie, desta forma, os principais fatores que interferem na propagação são a maturação dos propágulos, nutrição mineral da planta matriz, reguladores de crescimento, luminosidade, temperatura, umidade e técnica de propagação (WENDLING, 2003).

A obtenção de mudas limpas, ou seja, livre de doenças e pragas tem se constituído uma grande dificuldade. A qualidade sanitária é uma característica bastante importante, pois reflete diretamente no desenvolvimento das plantas e na sua produtividade. Algumas doenças são introduzidas e disseminadas principalmente por material de propagação, com isso, não se pode confiar na identificação de plantas doentes apenas por sintomas visíveis a olho nu, pois algumas plantas levam anos para apresentar sintomas visíveis, ou mesmo nem apresentam (FACHINELLO, 2005).

Nessa perspectiva, a técnica de micropropagação é uma excelente alternativa em produzir mudas de plantas com um elevado padrão de qualidade (morfológica, fisiológica e fitossanitária) e em larga-escala (RAJPUT et al., 2020).

2.2 Micropropagação

Micropropagação é o conjunto de técnicas usadas para obtenção de um grande número de mudas num espaço físico e temporal pequeno (Figura 5), as quais são geneticamente idênticas à planta matriz, além de possuírem alta qualidade fitossanitária (LAL et al., 2015). Sua designação refere-se ao tamanho dos propágulos utilizados, (THORPE, 2012), além disso, a propagação ocorre através de tubos de ensaios ou similares de vidro, parcialmente imersos em meio nutritivo e em condições assépticas e ambientais controladas (BARRUETO CID, 2001).

Essa técnica possui etapas que vão desde o estabelecimento da cultura in vitro até seu enraizamento, culminando com a aclimatização da microplanta (BASTOS et al., 2007). Diversos explantes podem ser utilizados para se iniciar a propagação in vitro como: ápices caulinares, gemas axilares e meristemas isolados (ARAÚJO; CARVALHO, 2005). Esse procedimento é importante, pois pode acelerar o desenvolvimento e a disponibilização de novas variedades de plantas, mantêm a identidade genética do material e permite o crescimento e multiplicação de células, tecidos, órgãos ou partes de órgãos de uma planta, baseando-se principalmente no aproveitamento da totipotência das células vegetais, (EMBRAPA, 2006; OLIVEIRA et al., 2010).

A técnica de micropropagação também possui algumas desvantagens como a possível ocorrência de variação somaclonal, a qual pode ocorrer devido a fatores como o genótipo, o tipo de explante, o número e a duração de subcultivos, as condições físicas do cultivo e a

composição do meio nutritivo (CHANNARAYAPPA, 2007). Além dessa, tem também a possível ocorrência da hiperidricidade, a qual é definida como o estado fisiológico em que a planta apresenta um acúmulo anormal de água no interior das células e tecidos (FERNANDEZ-GARCIA et al., 2011), podendo gerar a perda da capacidade regenerativa do tecido (GASPAR et al., 2000).

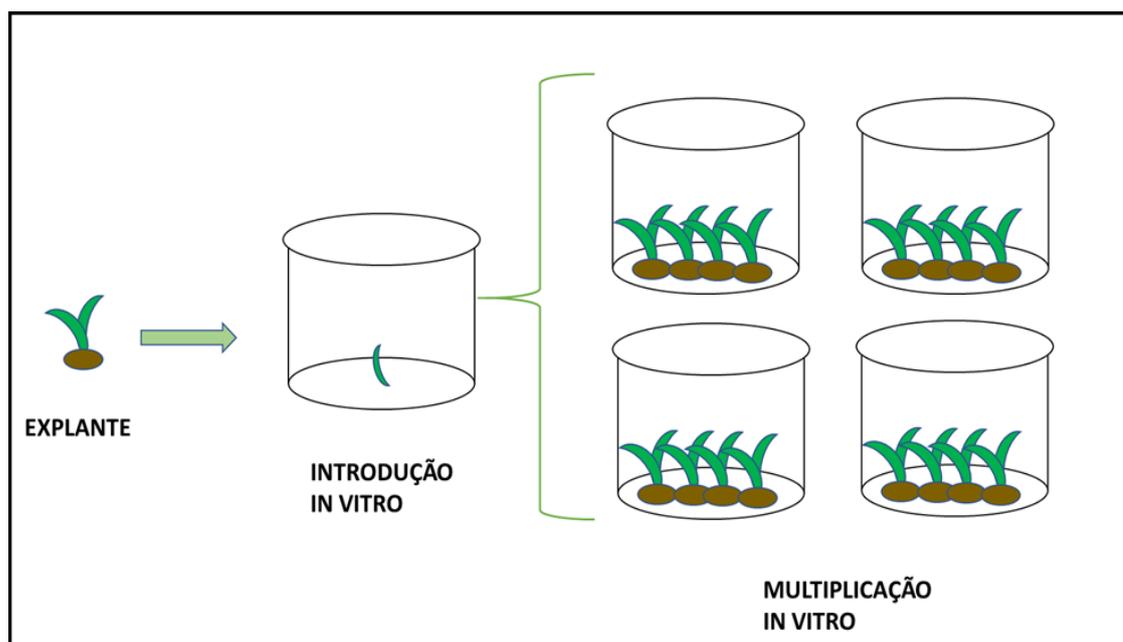


Figura 5. Sistema tradicional de micropropagação onde o explante é introduzido in vitro e a partir dele ocorre a multiplicação e geração de novos indivíduos (clones). Fonte: Melo (2011) modificado pela autora.

Sistemas de cultivos vêm sendo analisados quanto a sua eficiência no desenvolvimento e qualidade dos explantes, a partir da técnica de micropropagação, sendo eles o método tradicional em meio semissólido e os de imersão temporária com meio líquido (RITA®, BIT® e SETIS™). No entanto, o método de sistema de biorreator (BIT®), vem sendo mais utilizados devido a suas taxas de multiplicação superiores e a maior qualidade de brotos (OROZCO et al., 2023).

2.2.1 Sistema de biorreator de imersão temporária (BIT)

O Biorreator de Imersão Temporária (BIT) é composto por dois recipientes, sendo um deles contendo os explantes, enquanto o outro armazena o meio de cultivo. Os recipientes são conectados por meio de um tubo que é acionado pela pressão positiva de uma bomba de ar

(Figura 6). Assim, o sistema visa o rápido desenvolvimento e a multiplicação do material, reduzindo os custos de produção (LIMA, 2011).

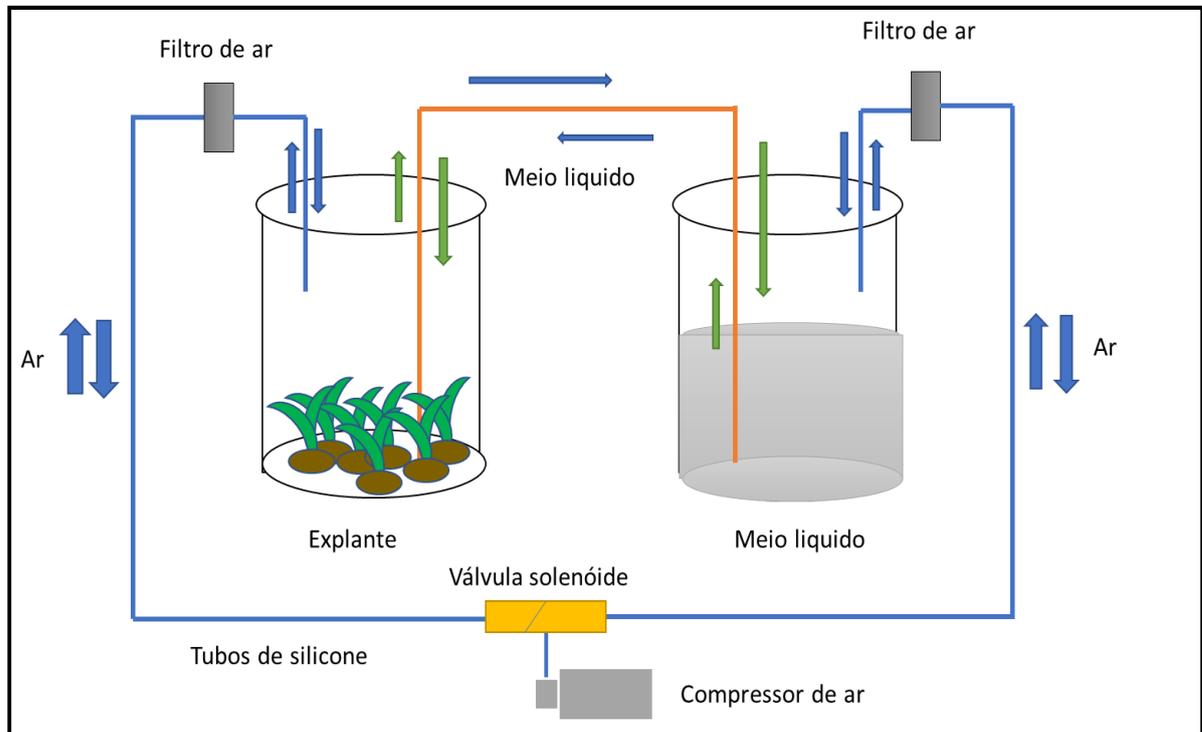


Figura 6. Sistema de biorreator de imersão temporária (BIT). Fonte: Melo (2011) modificado pela autora.

Essa tecnologia é bastante utilizada em laboratórios de pesquisa e em biofábricas (TAKAYAMA; AKITA, 1994), nas quais as fases de multiplicação, alongamento e enraizamento podem ser otimizadas, assim, apoiando o desenvolvimento mais completo de culturas micropropagadas (CARVALHO et al., 2019). Surge como uma excelente opção econômica, além de gerar uma condição necessária para suportar as adversidades na fase de aclimatização em casa de vegetação (TEIXEIRA, 2006).

A diferença desse sistema para os convencionais é vista a partir da eficiência e da agilidade no processo de produção de mudas, (ZIV et al., 2003) enquanto na convencional utilizam-se frascos pequenos, com menos quantidade de plantas que requerem uma maior manipulação de cultura (TAKAYAMA; AKITA, 1994).

As principais vantagens que torna esta técnica de extrema importância para área de cultura de tecidos vegetais no processo de propagação de plantas incluem: a simplicidade de

montagem do sistema; a redução dos custos com mão-de-obra; a adaptação a diversas espécies vegetais; o contato do meio de cultivo com toda a superfície dos explantes, aumentando a superfície de absorção de nutrientes e reguladores de crescimento; a uniformização da produção. Além desses benefícios, outras vantagens podem ser relevantes como o excelente suprimento de oxigênio pelo fornecimento da passagem de ar, evitando o acúmulo de gases nocivos e resultando em um melhor crescimento da cultura; diminuição da hiperhidricidade; aumento das taxas fotossintéticas; redução do custo total por unidade produzida e a produção de um grande número de mudas, favorecendo a produção em larga escala (ESCALONA et al., 1999; TEIXEIRA, 2006; LIMA, 2011).

Estudo como o de Lemos et al. (2001) sobre micropropagação de clones de banana (*Musa paradisiaca* cv. Terra) em biorreator de imersão temporária mostrou resultados satisfatórios utilizando essa técnica, obtendo uma maior produção de biomassa e crescimento dos explantes. Semelhantemente o estudo de Sambolín et al. (2023), com cultivo de *Musa* sp. também em Biorreator de Imersão temporária mostrou maiores taxas de crescimento e multiplicação para mudas. Para cana de açúcar por ser uma cultura de grande produção comercial, vem sendo utilizada em muitos estudos com utilização de biorreatores, o qual oferece vantagens pelas altas taxas de multiplicação, propagação em larga escala e rapidez com que o processo ocorre. Sendo assim, o estudo de Silva (2020) utilizou biorreatores em cana de açúcar e obteve resultados satisfatórios obtendo plântulas com um alto rendimento e com contaminação mínima.

2.3 Fidelidade genética/variação somaclonal

As plantas micropropagadas possuem como vantagem a manutenção da fidelidade genética, ou seja, a obtenção de plantas geneticamente uniformes, entretanto, diversos fatores podem induzir a ocorrência de variações somaclonais que interferem na multiplicação e manutenção de um determinado genótipo. Variações somaclonais são todos os tipos de variações fenotípicas que ocorrem em plantas regeneradas da cultura de tecidos (soma = vegetativo; clone = cópia idêntica). Neste cenário ocorre um prejuízo na fidelidade genética e consequentemente na qualidade do produto final, sendo prejudicial para fins comerciais (FREITAS; BERED, 2003).

Por outro lado, essas variações podem ocasionar nas plantas mudanças na morfologia e fisiologia, acarretando no aumento da tolerância ambiental (BINDIYA; KANWAR 2003;

CARVALHO, 2020). Tais variações podem ser positivas no melhoramento de plantas, podendo ocasionar variabilidade e gerar plantas com características de interesse (PAWEŁKOWICZ et al., 2021). A causa da ocorrência de variações somaclonais pode ser atribuída a alguns fatores decorrentes do processo de cultura de tecidos como: a condição do meio de cultura, produtos químicos e hormônios, os quais podem acabar ocasionando mutações, deleções e quebra cromossômica (LARKIN; SCOWCROFT 1981). Sendo assim, diferentes procedimentos vêm sendo utilizados para verificar a ocorrência dessa variação somaclonal, dentre a qual a utilização de marcadores moleculares (BENNICI et al., 2004).

Além das variações somaclonais, podem ocorrer variações epigenéticas ou de desenvolvimento (Figura 7), que são temporárias e causam alterações fenotípicas e/ou bioquímicas em decorrência da expressão de genes específicos. O ambiente “in vitro”, apesar de controlado, pode induzir alterações epigenéticas devido a diversos fatores como o tempo de cultivo, o número de subcultivos, a composição do meio de cultivo, a qualidade dos reagentes utilizados, qualidade da fonte de explante e o genótipo da planta (MELO et al, 2011). Neste contexto a análise de parâmetros fisiológicos, como dosagem de pigmentos fotossintetizantes (Clorofila total, Clorofila A, Clorofila B e Carotenoides) e parâmetros bioquímicos (Proteínas solúveis totais, carboidratos, Catalase, Superóxido dismutase, MDA, glutatona redutase, dentre outras) pode auxiliar na detecção de fatores de estresse que possam estar atuando nas plântulas em desenvolvimento.



Figura 7. Variedade de cana-de-açúcar RB872552 obtida por micropropagação em Biorreator de imersão temporária após seis ciclos de subcultivos. a- Plântulas com desenvolvimento dentro do esperado. b- Formação de “massas verdes”. Barra: 1cm. Fonte: MELO et al, (2011).

Alterações morfofisiológicas decorrentes da multiplicação de plantas in vitro afetam diretamente a qualidade do produto final e são um dos principais desafios das biofábricas e laboratórios de pesquisa. A detecção destas alterações ocorre ao longo do processo de produção, quando visíveis ao olhar crítico do operador, porém ferramentas de biologia

molecular têm sido utilizadas com sucesso para detecção de alterações. Marcadores moleculares diversos têm sido aplicados em análises da variabilidade fenotípica e genética em genótipos de cana-de-açúcar (DUTRA, 2010). Recentemente técnicas alternativas como a citometria de fluxo vem sendo utilizada para avaliação da fidelidade genética a partir de micropropagação in vitro de bananeira (UMA,2023).

2.4 Marcadores moleculares

Os marcadores moleculares são um dos tipos de marcadores genéticos, os quais são utilizados para avaliar diferenças genéticas entre dois ou mais indivíduos (SERROTE, 2020). Estes possibilitam a avaliação da variabilidade genética dentro e entre espécies distintas, pois são capazes de detectar polimorfismo no DNA. Além disso, possuem uma ampla amostragem do genoma, não sofrem influência ambiental e são independentes do estágio de desenvolvimento da planta (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 2008). Geralmente, um marcador molecular ideal deve ser altamente polimórfico, codominante, permitindo a discriminação efetiva entre homozigotos e heterozigotos (KORDROSTAMI; RAHIMI, 2015). Os marcadores dominantes possuem a vantagem de terem menor custo de desenvolvimento, aplicação em diversos organismos, analisa multilocos e não requer conhecimento prévio da espécie analisada, dessa forma diversos marcadores têm sido aplicados no estudo de fidelidade genética de plantas, dentre eles destacamos o ISSR e o SCoT, os quais tem o sistema de impressão digital utilizado para detectar polimorfismo (RAO, 2016).

Os marcadores moleculares ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) são amplamente utilizados em estudos referentes à caracterização genética, por apresentarem uma rápida diferenciação entre indivíduos, isso devido ao elevado grau de polimorfismo. Além disso, possui um baixo custo, alta reprodutibilidade e requer poucos equipamentos de laboratório para execução dos experimentos. (SANTANA et al., 2011; NG; TAN, 2015). O ISSR é um marcador molecular de herança dominante, ou seja, baseado na presença ou ausência de bandas, assim, não diferenciando indivíduos heterozigotos dos homozigotos (CANELA, 2016). No entanto, as principais vantagens desse marcador é que analisa locos múltiplos em uma única reação, não requer nenhum conhecimento prévio dos dados de DNA, sua amplificação via PCR (Polymerase Chain Reaction) utiliza apenas um único primer e a aplicação do PCR possibilita que apenas uma pequena quantidade de DNA seja usada nos procedimentos de avaliação (Figura 8) (AMITEYES, 2021; SHARAFI et al., 2017). O

marcador ISSR tem sido usado com frequência na análise de fidelidade clonal para cultura de tecidos de cana-de-açúcar (SHINGOTE,2019).

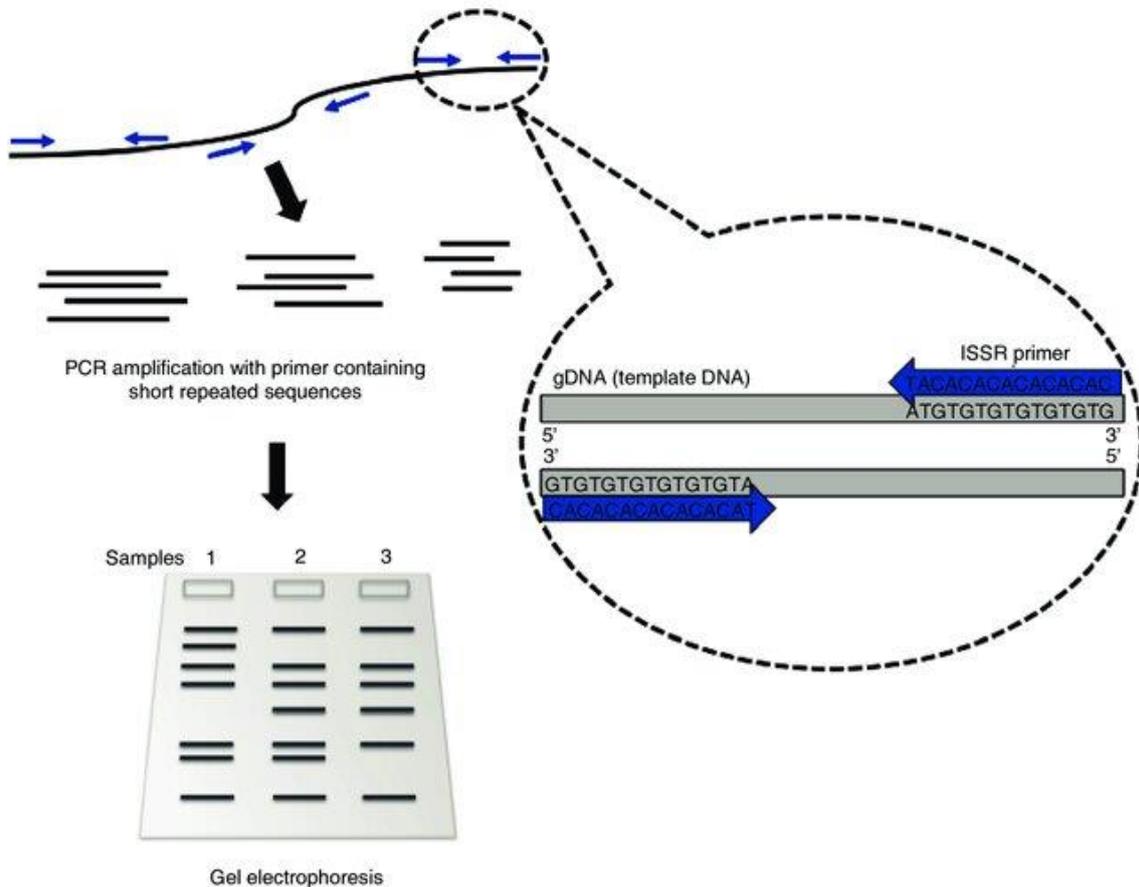


Figura 8. Esquemática da amplificação por PCR usando primer ISSR. Fonte: NG (2015).

Alguns trabalhos que utilizaram os iniciadores ISSR, asseguram a sua eficácia. Um estudo desenvolvido por Melo (2011) demonstrou que os marcadores ISSR utilizados confirmaram a fidelidade genética nas amostras da variedade RB872552 de cana-de-açúcar, em que dos 42 primers utilizados, 25 forneceram produtos de amplificação nítidos. Outro estudo sobre a presença de variações somaclonais em diferentes variedades de cana-de-açúcar por meio de marcadores ISSR, realizado por Costa, et al (2011), apresentou um ótimo desempenho demonstrando sua importância no melhoramento genético, ajudando no planejamento de futuros cruzamentos usando variedades tolerantes à seca com as cultivares sensíveis à seca mais produtivas.

O marcador de DNA *Start codon targeted* (SCoT) se baseia em regiões conservadas que flanqueiam o códon de iniciação da tradução ATG (Figura 9) e foi desenvolvido em

meados de 2009 (COLLARD, MACKILL, 2009). Este marcador foi desenvolvido a partir dos estudos de Joshi et al. (1997) e Sawant et al. (1999) e os resultados validados em genótipos de arroz (RAI, 2023). O SCoT é um marcador molecular dominante, o qual produz alto grau de polimorfismo, pois amplifica diferentes regiões do genoma. Além disso, possui algumas vantagens como: reação de amplificação de primer único, operação simples, baixo custo, reprodutíveis, alto polimorfismo e com alta informação genética (COLLARD, BCY, MACKILL, 2009). Recentemente um estudo utilizando Sálvia (Lamiaceae) demonstrou que os marcadores SCoT revelaram 97,78% de polimorfismo, indicando uma alta capacidade deste marcador em detectar loci polimórficos. (SONGPO et al. 2021). Ademais, de acordo com o estudo de Sathish (2018) foi demonstrado que o marcador molecular SCoT possui uma alta estabilidade genética nos clones derivados de explantes imaturos de enrolamento de folhas de cana-de-açúcar sem qualquer variação genética em plântulas produzidas in vitro. Além disso tem sido aplicado na análise genética da diversidade em germoplasma de cana-de-açúcar (QUE, 2014)

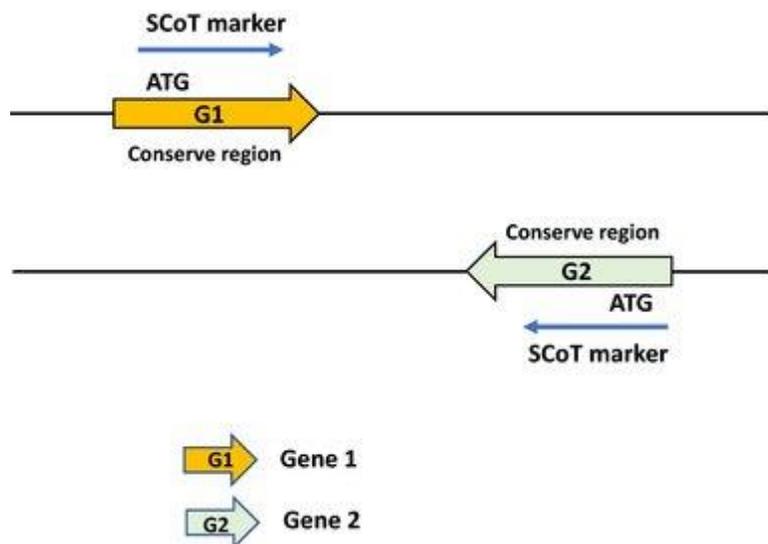


Figura 9. Esquematização da amplificação por PCR baseada em marcador SCoT. Fonte: RAI (2023).

Diante deste cenário o presente trabalho visa atender uma demanda essencial da Biofábrica Miguel Arraes, buscando avaliar o método de produção de mudas de cana-de-açúcar (var. RB041443 E RB92579) em larga escala por sistema de imersão temporária, assim como caracterizar bioquimicamente os clones produzidos ao longo do processo (subcultivos).

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

O objetivo geral deste trabalho é caracterizar o perfil bioquímico e avaliar a fidelidade genética de plântulas de cana-de-açúcar (variedade RB041443 e RB92579) obtidas por micropropagação em sistema de imersão temporária.

3.2 Específicos

- a. Selecionar marcadores moleculares do tipo ISSR e SCoT responsivos a possíveis variações somaclonais entre as plantas matrizes obtidas em campos experimentais e nas etapas de subcultivos (Micropropagação) da cana-de-açúcar (var. RB041443 e RB92579);
- b. Avaliar a eficiência dos marcadores ISSR e SCoT selecionados, na obtenção do perfil de identificação molecular (*Fingerprinting*) ao se comparar amostras oriundas de campo (matriz) e na etapa final da micropropagação (BIT) nas variedades RB041443 e RB92579;
- c. Estabelecer o perfil bioquímico das plântulas de cana-de-açúcar (var. RB041443 e RB92579) cultivadas *in vitro* a fim de identificar possíveis alterações causadas pelo processo de micropropagação.

4 METODOLOGIA

4.1 Coleta de material vegetal e introdução *in vitro*

Foram coletados colmos e folhas completas do terço médio das variedades de cana-de-açúcar RB041443 e RB92579, com 10 meses de idade, na Estação Experimental de Cana-de-Açúcar do Carpina, Universidade Federal Rural de Pernambuco (EECAC, UFRPE). Após a coleta, o colmo da cana de açúcar de cada variedade foi cortado em minirrebolos de aproximadamente 4 cm². Em seguida, foram realizados os tratamentos térmico e químico segundo os padrões da Biofábrica Governador Miguel Arraes (CETENE/MCTI).

Os minirrebolos pré-tratados foram cultivados em 23 bandejas de polietileno contendo 32 tubetes de 8x4 cm² cada, preenchidos com o substrato comercial Basaplant® para a brotação das gemas. As bandejas foram dispostas em casa de vegetação, sob condições controladas com irrigação automatizada por aspersão a cada 6 horas. Após a brotação, aos 36 dias, as plantas seguiram para introdução *in vitro*.

As folhas completas coletadas foram denominadas como matrizes para as análises de fidelidade genética a serem realizadas posteriormente. As folhas foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em ultrafreezer (-80°C) até o uso, no Laboratório de Diagnose Fitossanitária e Fidelidade Genética (LADIF) do CETENE.

A introdução *in vitro* foi conduzida sob supervisão de técnicos especializados da Biofábrica Governador Miguel Arraes (CETENE/MCTI). Para o cultivo *in vitro* foram coletados os palmitos com aproximadamente 5 cm de comprimento das mudas da planta matriz de cana-de-açúcar (var. RB041443 e RB92579), previamente cultivadas em casa-de-vegetação. Os palmitos foram introduzidos e desinfestados no Laboratório de Produção seguindo os padrões e procedimentos adotados pela Biofábrica Governador Miguel Arraes (CETENE/MCTI). A inoculação foi realizada sob condições assépticas em meio de cultura MS semi-sólido (MURASHIGE; SKOOG, 1962), pH 5,8, suplementado com 30 g.L⁻¹ de sacarose, 0,5 g.L⁻¹ de inositol na presença de 6-benzilaminopurina (BAP) e autoclavado por 121°C por 15 minutos. Os explantes foram incubados em sala de crescimento no escuro por 7 dias a 25± 2°C. Em seguida, foram mantidos sob fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de 50 μmol.m⁻².s⁻¹ constante. Após 30 dias, os explantes perfilharam e, por sua vez, foi realizada uma repicagem trocando do meio semi-sólido para o meio líquido, para que já pudessem ocorrer as fases dos subcultivos.

4.2 Coleta de plântulas dos subcultivos 1 a 5 e biorreatores de imersão temporária (BIT)

As plântulas micropropagadas de cana-de-açúcar (var. RB041443 e RB92579), provenientes da Biofábrica Governador Miguel Arraes (CETENE/MCTI), foram coletadas em triplicata após passarem pelos 1°, 2°, 3°, 4° e 5° subcultivos de multiplicação e biorreatores de imersão temporária (BIT), as quais foram realizadas com uma diferença de 15 dias de uma coleta para outra, e imediatamente estocadas a -80°C até o uso (Figura 10).

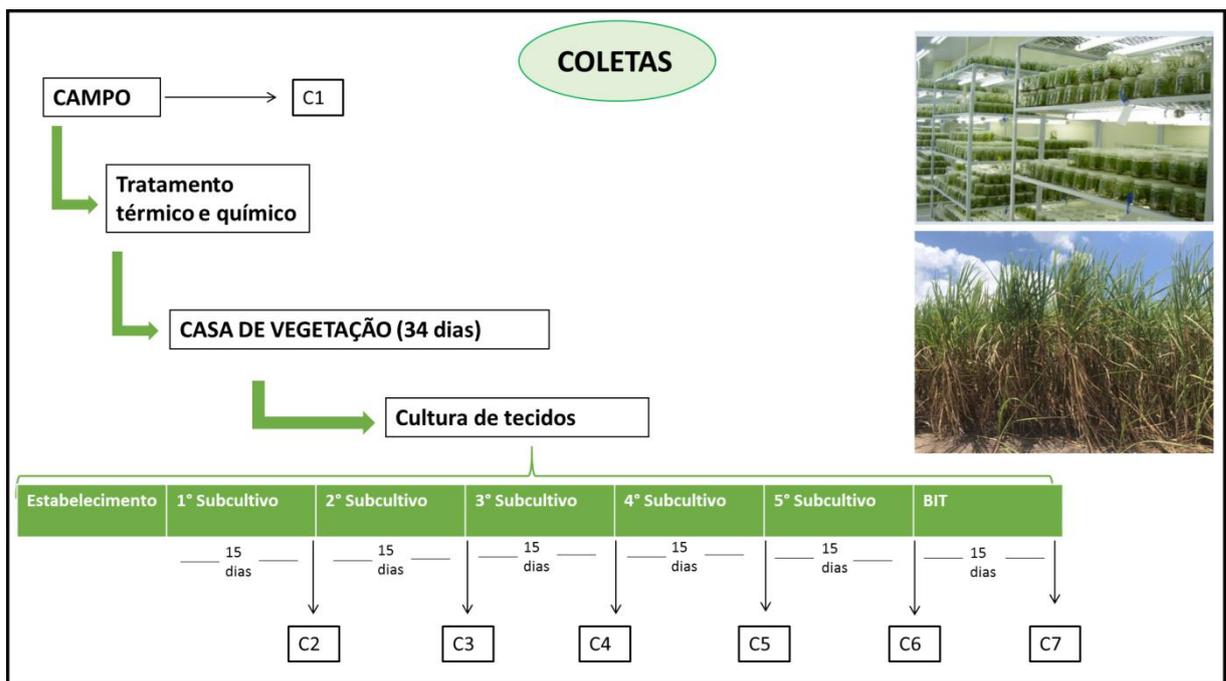


Figura 10. Esquematização das realizações das coletas. Fonte: A autora.

4.3 Extração de DNA genômico

4.3.1 Método convencional

O DNA total foliar da variedade RB92579 de cana-de-açúcar foi extraído a partir das plantas matrizes de cana-de-açúcar, plântulas de cada subcultivo (1°, 2° e 3°, 4° e 5°) e plântulas micropropagadas introduzidas em biorreatores de imersão temporária (BIT).

A extração foi realizada em triplicata, a partir do método descrito por Khan (2004) modificado em associação ao kit comercial Wizard® Genomic DNA Purification (Promega®) (Protocolo desenvolvido no Laboratório de Diagnóstico Fitossanitário e Fidelidade Genética (LADIF / CETENE – Dados não publicados). Inicialmente, foram pesadas 300 mg do tecido foliar fresco, respectivamente, e macerado em nitrogênio líquido utilizando-se o pistilo e almofariz, até que fosse obtido um pó bastante fino. Em seguida, as amostras foram

transferidas para microtubos de 2,0 mL, homogeneizadas em 500 μ L de tampão de extração [2% CTAB, 0,02 M de EDTA, 0,1 M de Tris-HCl (pH 8,0), 1% de PVP (polivinilpirrolidona), 0,2% 2- β -mercaptoetanol] sob agitação em vórtex durante 15 segundos. Em seguida, os tubos foram incubados em banho-maria a 65°C, durante 1 hora com homogeneização a cada 20 minutos. Após a incubação as amostras foram resfriadas em temperatura ambiente por 5 min, e em seguida foi adicionado 500 μ L de fenol equilibrado pH7.8 em Tris-HCl. Os tubos foram centrifugados a 10.000 rpm durante 5 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo de 1,5 mL, e foi adicionado igual volume de clorofórmio gelado. Após agitação leve, os tubos foram centrifugados a 10.000 rpm durante 5 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo de 1,5 mL, e para a precipitação do DNA, foram adicionados ao sobrenadante recuperado 700 μ L de isopropanol absoluto gelado e misturado por inversão. Em seguida, todo o volume foi transferido para as colunas do kit comercial (Promega®) e as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 2 minutos, a 4°C. O filtrado foi descartado e a coluna foi submetida a duas lavagens com o tampão de lavagem do kit comercial (Promega®). As colunas foram secas por centrifugação a 10.000 rpm por 1 minuto e transferidas para novos microtubos de 1,5 mL. Em seguida, os precipitados de DNA na coluna foram ressuspensos em 30 μ L de água de injeção e centrifugados novamente a 10.000 rpm por 2 minutos. Depois, o filtrado foi transferido novamente para a coluna e mantidos à temperatura ambiente 5 minutos. Por fim, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 2 minutos e armazenadas a -20°C (Figura 11).



Figura 11. Extração de DNA genômico de cana de açúcar, da variedade RB92579 no Laboratório de Diagnóstico Fitossanitário e Fidelidade Genética (CETENE). Fonte: A autora.

O DNA total obtido foi corado com o reagente SYBRTM Safe DNA Gel Stain, e aplicado em gel de agarose 1,2%. Em seguida, o gel foi submetido à eletroforese em tampão TBE [(Tris-Borato 0,09M e EDTA 0,002M; pH 8,0)], em sistema de eletroforese horizontal (Loccus Biotecnologia), utilizando os seguintes parâmetros: 110V, 150 mA e 30 minutos. Após a corrida, o resultado foi visualizado em sistema de fotodocumentação L-PIX HE (Loccus Biotecnologia) na presença de luz UV. As amostras de DNAs extraídas foram quantificadas em espectrofotômetro NanoDrop® 2000 (Thermo Fisher Scientific) e suas concentrações obtidas em ng/μL. Para verificação da pureza do DNA extraído, foi obtido a razão das absorbâncias ($A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ e $A_{260\text{nm}}/A_{230\text{nm}}$).

4.3.2 Método automático baseado em beads magnéticas

A extração automática do DNA genômico total das plantas matrizes de cana-de-açúcar, das plantas do experimento em casa de vegetação, dos seus respectivos clones de cada subcultivo (1°, 2°, 3°, 4° e 5°) e plântulas micropropagadas introduzidas em biorreatores de imersão temporária (BIT) (var. RB041443), foi realizada a partir de 100 mg de folhas frescas utilizando o kit comercial Extracta® (Cod. MLTD-PU16-B) associado ao extrator automático de ácidos nucleicos Extracta® 16 (Loccus Biotecnologia®). Inicialmente, as amostras foram pesadas em tubos de microcentrífuga de 2,0 mL com adição de duas esferas de zircônio, resfriadas em nitrogênio líquido e, em seguida, realizada a disrupção mecânica no TissueLyser LT (QIAGEN©) utilizando cinco ciclos de agitação por 60 segundos com frequência de oscilação de 50 Hz, até a obtenção de um pó fino. Em seguida, a extração automática de DNA foi realizada segundo as recomendações do fabricante e envolveu cinco etapas: lise celular, associação dos ácidos nucleicos às esferas de ferro magnetizadas, captura das esferas, lavagem e eluição. Por fim o material genético foi armazenado em freezer -80°C até o uso (Figura 12).

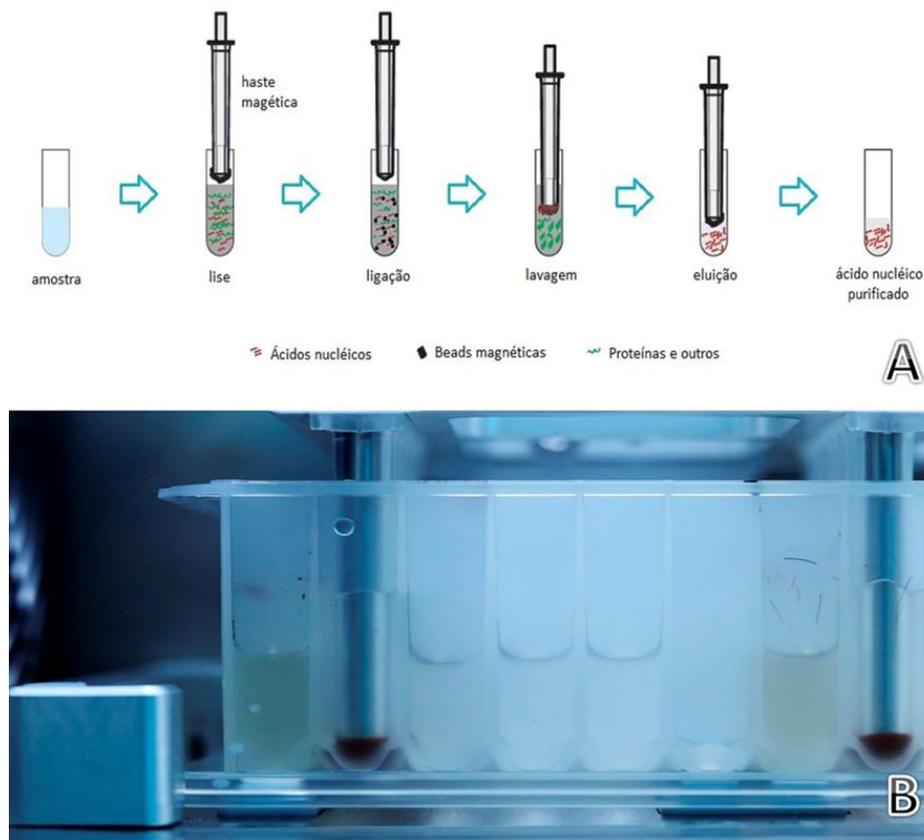


Figura 12. Extração de DNA genômico de cana de açúcar, da variedade RB041443. A. Esquema do método de extração automatizada utilizando beads magnéticas. B- Detalhe da placa contendo reagentes utilizados na extração automatizada e da haste magnética. Fonte: Loccus.

4.3.3 Seleção de marcadores ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) e SCoT (Start codon targeted)

Foram selecionados 38 oligonucleotídeos do tipo ISSR UBC (University of British Columbia), segundo protocolo de Borner e Branchard (2001) com modificações para o presente estudo (ANEXO 1). Para os do tipo SCoT, segundo protocolo Collard e Mackill (2009) foram selecionados 38 oligonucleotídeos (ANEXO 2). Os oligonucleotídeos foram avaliados quanto à sua eficiência e reprodutibilidade utilizando o DNA da planta matriz como referência. Cada reação foi colocada em um microtubo de 0,2 mL contendo: 1x PCR SuperMix 2X (Bio-Helix); 60 ng de DNA; 1.5 μ M do oligonucleotídeo ISSR ou SCoT, e água ultrapura q.s.p. reação em 15 μ L de volume final. A partir disso, a amplificação do DNA foi realizada em um termociclador TC-9639 (Loccus), usando o seguinte programa de ciclagem: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguida por desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 47-61 °C (variou de acordo com cada ISSR OU SCoT) por 30 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto. Os passos de desnaturação, anelamento e extensão foram

repetidos 30 vezes, e em seguida a reação foi finalizada por uma extensão a 72°C por 7 minutos. Os fragmentos amplificados foram separados em gel de agarose 1,5%, corado com SYBR™ Safe DNA Gel Stain, com eletroforese a 100 V em tampão TBE [(Tris-Borato 0,09M e EDTA 0,002M; pH 8,0)] por 1 hora e 20 minutos. O marcador de peso molecular utilizado foi o DNA Ladder RTU 1 kb (Kasvi). Após a eletroforese, o gel foi fotodocumentado em sistema L-PIX HE (Loccus Biotecnologia). Os perfis de amplificação obtidos a partir dos marcadores ISSR e SCoT foram selecionados para posteriores análises de fidelidade genética.

4.3.4 Análises de dados

As imagens dos géis foram avaliadas para detecção de polimorfismos no padrão de bandas e a diversidade genética quantificada a partir de uma matriz de dados binários correspondente à presença (1) ou ausência (0) das bandas geradas na amplificação pelas reações de PCR, para cada um dos marcadores ISSR e SCoT. Apenas bandas claras, reprodutíveis e com a mesma mobilidade foram consideradas na análise, já as bandas de baixa intensidade e nitidez foram desconsideradas. A dissimilaridade genética entre as amostras foi estimada pelo índice de Jaccard (1908) utilizando o programa DARWin (versão 6.0.021) (PERRIER; JACQUEMOUD-COLLET, 2006). O dendrograma fenético foi construído por meio do método de agrupamento de vizinhos (Neighbor-joining) com uso do programa DARWin (versão 6.0.021) (PERRIER; JACQUEMOUD-COLLET, 2006). A confiabilidade e robustez dos fenogramas foram testadas através da análise bootstrap com 10.000 repetições.

4.4 Avaliação fisiológica e bioquímica

4.4.1 Análise de pigmentos fotossintetizantes

A análise de pigmentos fotossintetizantes seguiu o método de extração em acetona 80% (LICHTENTHALER, 1987), em ambiente fechado, na presença de luz verde, utilizando 100 mg de tecido vegetal (folhas) a partir das plantas matrizes, mudas micropropagadas de cana-de-açúcar (1°, 2°, 3°, 4° e 5° subcultivos) e plântulas micropropagadas introduzidas em biorreatores de imersão temporária (BIT) da variedade RB041443 e RB92579.

Foram mensuradas as absorvâncias (ABS) em 470, 646.8, 663.2 e 710 nm. Os valores obtidos foram utilizados nas equações abaixo para calcular a concentração dos pigmentos fotossintetizantes:

$$\text{Clorofila "a"} (\text{Ca}) = 12,25 \times \text{ABS663.2} - 2,79 \times \text{ABS646.8}$$

$$\text{Clorofila "b"} (\text{Cb}) = 21,50 \times \text{ABS646.8} - 5,10 \times \text{ABS663.2}$$

$$\text{Clorofilas totais C (a+b)} = 7,15 \times \text{ABS663.2} + 18,71 \times \text{ABS646.8}$$

$$\text{Carotenoides (xantofilas + caroteno)} = (1000 \times \text{ABS470} - 1,82 \times \text{Ca} - 85,02 \times \text{Cb}) / 198$$

4.4.2 Determinação de malondialdeído (MDA)

Para estimativa de possível estresse oxidativo ao longo dos subcultivos foi realizada análise de peroxidação lipídica, com a quantificação indireta de seu produto, o malondialdeído (MDA), pelo método das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS ou TBA) (Halliwell & Gutteridge, 1989), seguindo o proposto por Heath & Packer (1968), com algumas modificações (DU & BRAMLAGE, 1992; HODGES et al., 1999; VELIKOVA et al., 2000; FU & HUANG, 2001).

O tecido vegetal congelado, imerso em nitrogênio líquido, foi triturado em almofariz e homogeneizado em 5 mL de ácido tricloro acético (TCA 0,1% massa volume-1). O homogeneizado foi centrifugado a 10.000 g por 20 min em centrífuga refrigerada a 4 °C (Sigma 3K30), e 0,5 mL do sobrenadante foi adicionado a 1 mL de TCA 20% + TBA 0,5% (peso por volume). Após agitada, a mistura foi incubada em água a 90 °C por 30 min e paralisada a reação ao final, por imersão dos tubos em banho de gelo. Foi feita então nova centrifugação a 10.000 g por 5 min. Outros 0,5 mL do sobrenadante foram adicionados a 1 mL de TCA 20%, sendo agitados, incubados, imersos em banho de gelo e centrifugados como já descrito. Durante esse processo, as amostras estiveram sempre refrigeradas em banho de gelo, excetuando-se a incubação. Foi então lida a absorbância (Spectronic® Genesis™ II) a 532 e a 600 nm, em que 532 nm representam à máxima absorção do complexo MDA-TBA e 600 nm a absorção de turbidez não específica (HEATH & PACKER, 1968; DU & BRAMLAGE, 1992; HODGES et al., 1999; VELIKOVA et al., 2000; FU & HUANG, 2001).

4.4.3 Determinação de proteínas solúveis totais

A concentração de proteína foi determinada de acordo com Bradford (1976) usando albumina de soro bovino como padrão. Para a extração utilizou-se aproximadamente 0,2 g de material vegetal, os quais foram macerados em nitrogênio líquido, juntamente com 20% de PVPP, até a obtenção de um pó fino ao qual se adicionou 2 mL de tampão fosfato de potássio

100mM, pH 7,5, contendo 1 mM de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e 3 mM de ditioneitol (DTT). Em seguida, o homogeneizado foi centrifugado a 10.000g, 4 °C por 15 minutos e o sobrenadante foi retirado e colocado em placas de Elisa, juntamente com o reagente de Bradford, após isso esperou-se 10 minutos e analisou a leitura no equipamento Elisa, utilizando a curva padrão de albumina de soro bovino (BSA).

4.4.4 Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância com posterior comparação das médias. As análises estatísticas foram realizadas no programa estatístico GradPrism (9.0.0).

4.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.5.1 Obtenção de material vegetal de cana-de-açúcar das variedades RB041443 e RB92579

Foram introduzidos 736 minirrebolos da variedade RB041443 e 236 da variedade RB92579 (Figura 13 e 14). A introdução *in vitro* dos palmitos obtidos, ocorreu dentro dos padrões esperados, gerando material vegetal com qualidade suficiente para o isolamento dos meristemas e posterior introdução *in vitro* (Figura 15). Após 30 dias, os explantes perfilharam e, por sua vez, foi realizada uma repicagem trocando do meio semi-sólido para o meio líquido, para que já pudessem ocorrer as fases dos subcultivos (Figura 16). Em seguida os explantes foram repicados para um novo meio de cultura a cada 15 dias, e a cada ciclo foi realizada a coleta de material vegetal para análises de fidelidade genética e bioquímica.



Figura 13. Realização do tratamento térmico seriado (TTS), na Biofábrica Governador Miguel Arraes (CETENE/MCTI). A) Corte dos colmos em minirrebolos, com auxílio da guilhotina; B) minirrebolos; C) Tratamento térmico dos minirrebolos em banho maria; D) Tratamento químico dos minirrebolos. Fonte: A autora.

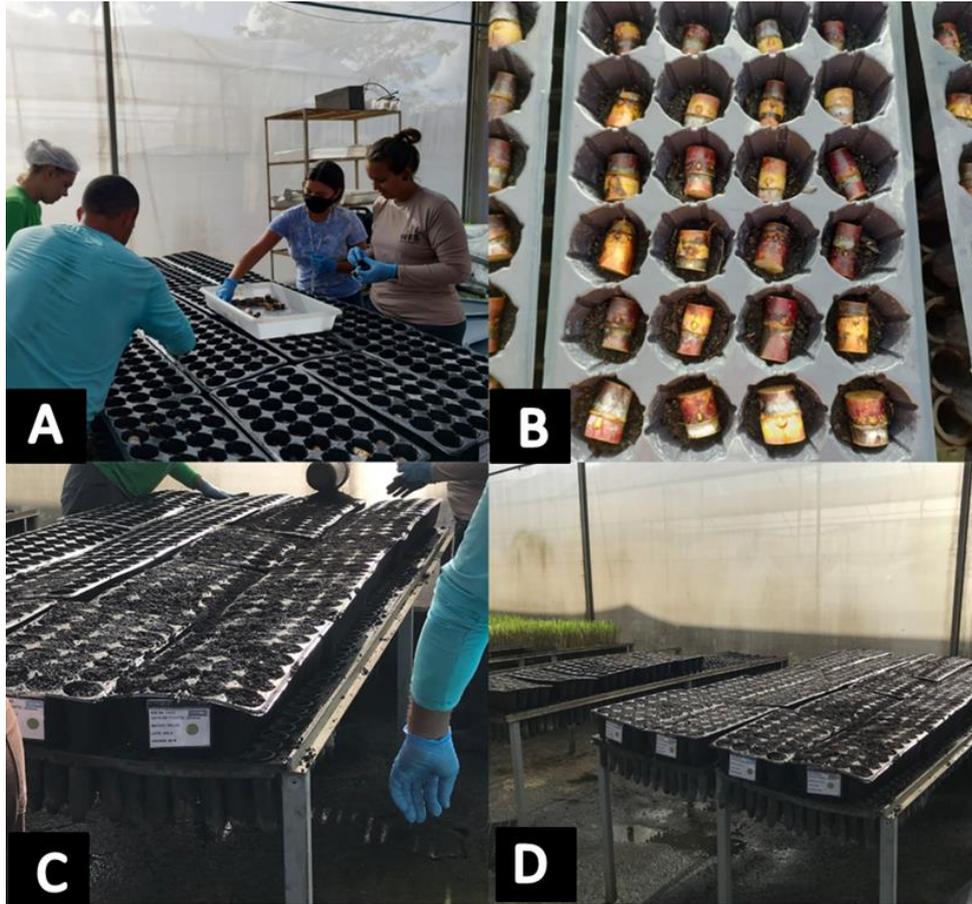


Figura 14. Montagem do experimento em casa de vegetação, na Biofábrica Governador Miguel Arraes (CETENE/MCTI). A e B) Posicionando os minirrebolos com a gema para cima; C e D) Cobrindo os minirrebolos com o substrato Basaplant®. Fonte: A autora.

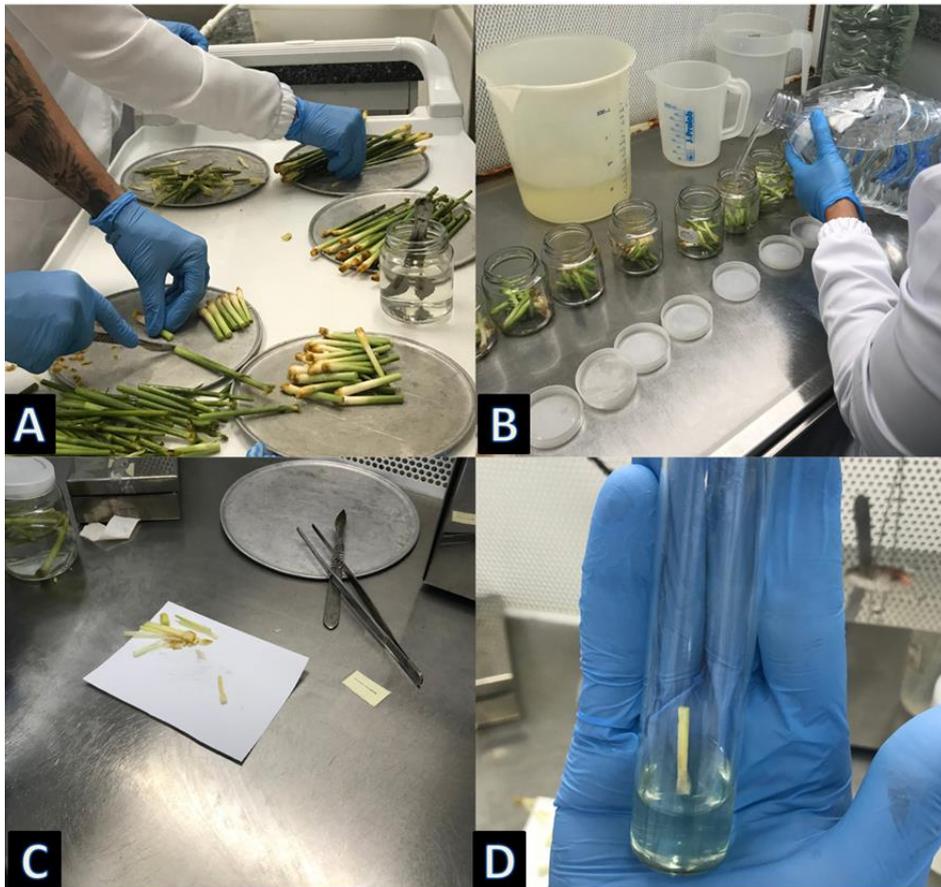


Figura 15. Introdução da cana de açúcar variedade RB041443 no laboratório de produção, da Biofábrica Governador Miguel Arraes (CETENE/MCTI) para o método de micropropagação. A) Corte dos palmitos; B) Lavagens dos palmitos; C e D) Inoculação do explante em meio de cultura semi-sólido. Fonte: A autora.



Figura 16. Troca do meio semi-sólido (MURASHIGE; SKOOG, 1962) para o meio líquido, no laboratório de produção, da Biofábrica Governador Miguel Arraes (CETENE/MCTI). Fonte: A autora.

4.5.2 Extração de DNA genômico e quantificação

As folhas coletadas das plantas matrizes, subcultivos 1, 2, 3, 4 e 5, e plântulas micropropagadas introduzidas em biorreatores de imersão temporária (BIT) foram submetidas à extração de DNA genômico, em pool contendo amostras em triplicatas, utilizando o método CTAB modificado para a variedade RB92579 e o método automatizado Extracta® 16 (Loccus Biotecnologia®) para a variedade RB041443. A partir da eletroforese em gel de agarose 1,2% é possível observar que o DNA genômico obtido das folhas de cana-de-açúcar (var. RB041443 e RB92579), estão íntegros (Figura 17). O método automatizado permite realizar extrações de DNA em larga escala, um fator essencial considerando uma rotina de produção na biofábrica, porém tal método se mostrou menos eficaz, quando comparado ao método convencional.

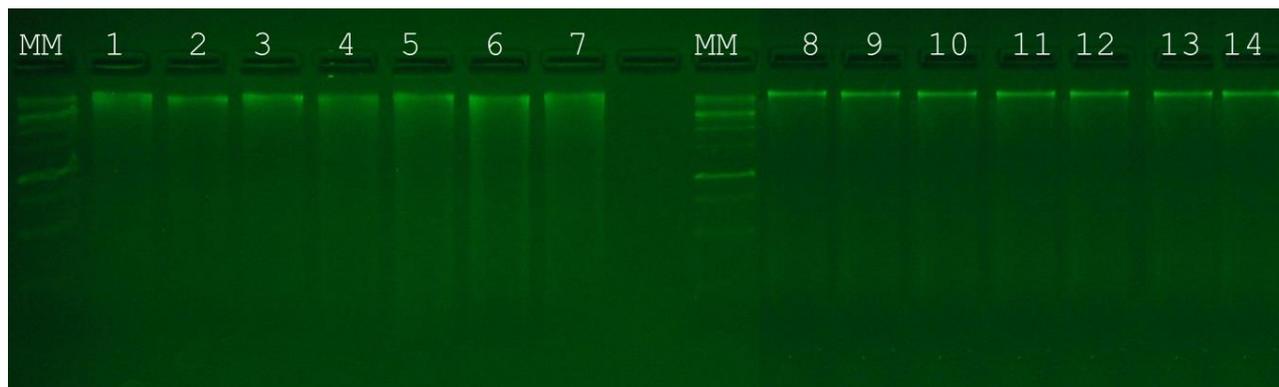


Figura 17. Gel de agarose 1,5% para verificação da integridade das amostras de DNA foliar isolados a partir de cana-de-açúcar. 1- Matriz; 2- subcultivo 1; 3- subcultivo 2; 4- subcultivo 3; 5- subcultivo 4; 6- subcultivo 5, 7- plântulas micropropagadas introduzidas em biorreatores de imersão temporária (BIT) (var. RB92579). 8- Matriz; 9- subcultivo 1; 10- subcultivo 2; 11- subcultivo 3; 12- subcultivo 4; 13- subcultivo 5, 14- plântulas micropropagadas introduzidas em biorreatores de imersão temporária (BIT) (var. RB041443). MM. Marcador molecular 1 kb LADDER Kasvi

A quantificação dos DNAs extraídos da planta matriz, subcultivos 1, 2, 3, 4 e 5, e das plântulas micropropagadas introduzidas em biorreatores de imersão temporária (BIT) (var. RB041443) apresentaram uma média de concentração de 375,07 ng/ μ L e razão $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ média de 2,04 indicando a alta pureza do DNA isolado (Tabela 2). Já para a variedade RB92579, a quantificação dos DNAs extraídos da planta matriz, subcultivos 1, 2, 3, 4 e 5, e das plântulas micropropagadas introduzidas em biorreatores de imersão temporária (BIT) apresentaram uma média de concentração de 1747,9 ng/ μ L e razão $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ média de 2,06 indicando a alta pureza do DNA isolado (Tabela 3). Assim, devido à alta eficiência do método Extracta® e do método CTAB modificado as amostras de DNAs foram utilizadas nas análises de ISSR e SCoT-PCR.

A análise de pureza das amostras foi realizada utilizando como parâmetros as leituras de absorbância nas faixas $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ e $A_{260\text{nm}}/A_{230\text{nm}}$. A razão das absorbâncias $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ é uma boa indicadora de contaminação por proteína, ou seja, o resultado da divisão expressa a proporção entre a quantidade de DNA e a quantidade de proteínas extraídos, onde valores entre 1,8 e 2,0 indicam uma amostra de DNA pura. Se esta razão for inferior a 1,8, possivelmente, há presença de proteínas, compostos fenólicos ou outros contaminantes (LEHNINGER et al., 2004). Para a razão das absorbâncias $A_{260\text{nm}}/A_{230\text{nm}}$ é desejado obter valores entre 2,0 e 2,2, sendo valores menores do que o esperado, um indicativo de compostos orgânicos ou agentes caotrópicos, que absorvem a 230 nm.

Tabela 2. Quantificação do DNA genômico, em triplicata, da variedade RB041443 de cana-de-açúcar extraída pelo método automatizado Extracta® 16(Loccus Biotecnologia®). **1.** Matriz; **2.** Subcultivo 1; **3.**Subcultivo 2; **4.**Subcultivo 3; **5.**Subcultivo 4; **6.**Subcultivo 5; **7.** Clones introduzidos no sistema de biorreator de imersão temporária (BIT).

Amostras	ng/uL	A260/280	A260/230
1	295,1	1,93	2,36
2	219,4	2,07	2,43
3	434,8	2,05	2,36
4	276,9	2,04	2,37
5	288,7	2,04	2,38
6	397,1	2,06	2,39
7	713,5	2,11	2,45

Tabela 3. Quantificação do DNA genômico, em triplicata, da variedade RB92579 de cana-de-açúcar extraída pelo método CTAB modificado. **1.** Matriz; **2.** Subcultivo 1; **3.**Subcultivo 2; **4.**Subcultivo 3; **5.**Subcultivo 4; **6.**Subcultivo 5; **7.** Clones introduzidos no sistema de biorreator de imersão temporária (BIT).

Amostras	ng/uL	A260/280	A260/230
1	2116,4	1,96	1,67
2	1022,4	2,08	2,24
3	1882,1	2,10	2,26
4	1764,4	2,08	2,26
5	1704,1	2,08	2,23
6	1116,9	2,06	2,17
7	2628,8	2,07	2,27

4.5.3 Análise de fidelidade genética de cana-de-açúcar (variedades RB041443 e RB92579) utilizando marcadores ISSR

Foram avaliados 38 oligonucleotídeos do tipo ISSR-UBC, dos quais 20 apresentaram bandas monomórficas e polimórficas que variaram de 200 a 3000 pb, a partir do DNA genômico da planta matriz de cana-de-açúcar (var. RB041443) oriunda do campo: ISSR-9, ISSR-10, ISSR-12, ISSR-13, ISSR-19, ISSR-22, ISSR-23, ISSR-24, ISSR-27 e ISSR-29, ISSR-3, ISSR-813, ISSR-834, ISSR-835, ISSR-836, ISSR-844, ISSR-849, ISSR-864, ISSR-866, ISSR-868, exibindo qualidade adequada no perfil de eletroforético (Figura 18 e 19).

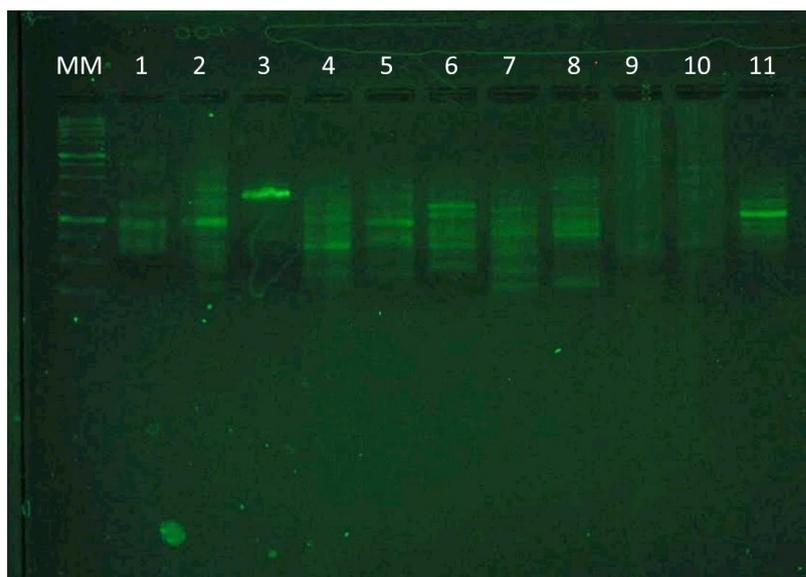


Figura 18. Perfil eletroforético de DNA genômico das plantas matrizes de cana-de-açúcar (var. RB041443) utilizando oligonucleotídeos do tipo ISSR UBC. **MM.** Marcador molecular 1 kb; **1.** ISSR-9; **2.** ISSR-10; **3.** ISSR-12; **4.** ISSR-13; **5.** ISSR-19; **6.** ISSR-22; **7.** ISSR-23; **8.** ISSR-24; **9.** ISSR-25; **27.** ISSR-27; **11.** ISSR-29.

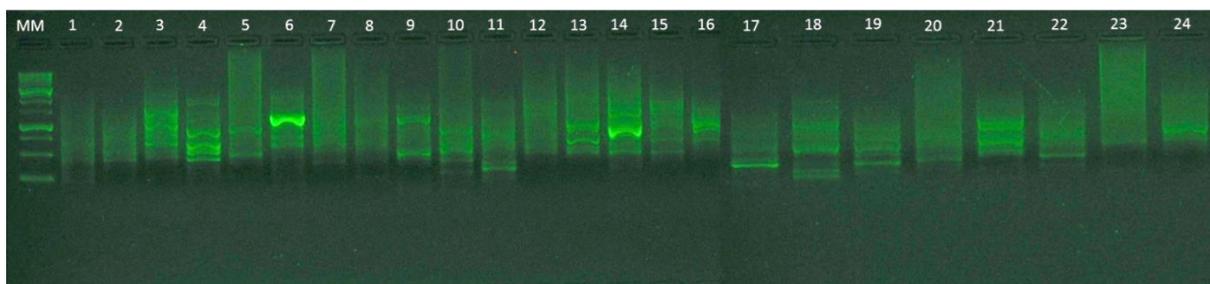


Figura 19. Perfil eletroforético de DNA genômico das plantas matrizes de cana-de-açúcar (var. RB041443) utilizando oligonucleotídeos do tipo ISSR UBC. **MM.** Marcador Molecular 1 kb; **1.** UBC 3; **2.** UBC 810; **3.** UBC 813; **4.** UBC 815; **5.** UBC 817; **6.** UBC 824; **7.** UBC 826; **8.** UBC 828; **9.** UBC 844; **10.** UBC 848; **11.** UBC 857; **12.** UBC 859; **13.** UBC 864; **14.** UBC 866; **15.** UBC 868; **16.** UBC 873; **17.** UBC 834; **18.** UBC 835; **19.** UBC 836; **20.** UBC 849; **21.** UBC 855; **22.** UBC 856; **23.** UBC 858; **24.** UBC 860

Os marcadores ISSR selecionados amplificaram um total de 168 bandas, com uma média de 8,4 bandas por primer. Desse total, 82 fragmentos foram polimórficos enquanto 86 foram monomórficos. Dos 20 marcadores ISSR selecionados, o ISSR-9 não apresentou nenhuma banda monomórfica (100% polimórfico), enquanto o ISSR-22, ISSR-3 e o ISSR-864 exibiu o mesmo padrão de bandas para todas as amostras analisadas (monomórfico). Além disso, o oligonucleotídeo ISSR-19 apresentou o maior número de regiões amplificadas e polimórficas, ou seja, das 14 bandas observadas 12 são polimórficas (Tabela 4). Dessa forma os marcadores ISSR-9 e ISSR-19 são potenciais marcadores de seleção com alta

especificidade para a variedade RB041443 de cana-de-açúcar visando estudos de fidelidade genética.

Tabela 4. Oligonucleotídeos do tipo UBC ISSR usados para amplificação do DNA foliar de cana-de-açúcar (variedade RB041443). Ta = temperatura de anelamento. R = (A, G), V = (A, C, G) e Y = (C, T).

ISSR UBC	Sequência (5' → 3')	TA (°C)	Total de bandas amplificadas	Banda monomórficas	Bandas polimórficas
9	CTC TCT CTC TCT CTC TG	53	8	0	8
10	CAC ACA CAC ACA CAC AA	48	7	4	3
12	TCT CTC TCT CTC TCT CG	53	5	1	4
13	ACA CAC ACA CAC ACA CC	53	9	8	1
19	CAC ACA CAC ACA CAC ARG	53	14	2	12
22	ACA CAC ACA CAC ACA CYT	53	7	7	0
23	ACA CAC ACA CAC ACA CYA	53	10	1	9
24	ACA CAC ACA CAC ACA CYG	53	13	5	8
27	TGT GTG TGT GTG TGT GRA	53	5	1	4
29	GAC AGA CAG ACA GAC A	53	13	9	4
3	GAG GAG GAG GAG GAG GAG	61	8	8	0
813	CTC TCT CTC TCT CTC TT	50	8	6	2
834	AGA GAG AGA GAG AGA GYT	53	8	5	3
835	AGA GAG AGA GAG AGA GYC	53	9	5	4
836	AGA GAG AGA GAG AGA GYA	53	8	5	3
844	CTC TCT CTC TCT CTC TRC	55	9	6	3
849	GTG TGT GTG TGT GTG TYA	53	6	2	4
864	ATG ATG ATG ATG ATG ATG	47	5	5	0
866	CTC CTC CTC CTC CTC CTC	61	6	4	2
868	GAA GAA GAA GAA GAA GAA	47	10	2	8

Ademais, para a variedade RB92579 foram analisados 38 oligonucleotídeos do tipo ISSR-UBC, dos quais 13 apresentaram bandas monomórficas e polimórficas que variaram de 200 a 3000 pb, a partir do DNA genômico da planta matriz de cana-de-açúcar oriunda do campo: ISSR-3, ISSR-810, ISSR-813, ISSR-815, ISSR-817, ISSR-836, ISSR-848, ISSR-855, ISSR-859, ISSR-864, ISSR-866, ISSR-868 e ISSR-873 exibindo qualidade adequada no perfil de eletroforético (Figura 20 e 21).

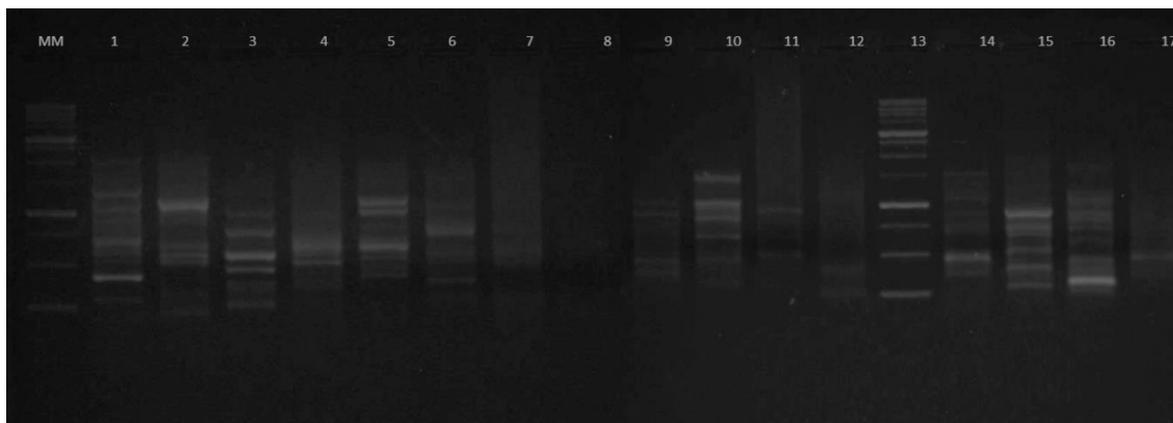


Figura 20. Perfil eletroforético de DNA genômico das plantas matrizes de cana-de-açúcar (var. RB92579) utilizando oligonucleotídeos do tipo ISSR UBC. **MM.** Marcador molecular 1 kb; **1.** UBC-834; **2.** UBC-835; **3.** UBC-836; **4.** UBC-849; **5.** UBC-855; **6.** UBC-856; **7.** UBC-858; **8.** UBC-860; **9.** UBC-810; **10.** UBC-813; **11.** UBC-817; **12.** UBC-828; **13.**MM **14.** UBC-844; **15.** UBC-848; **16.** UBC-857; **17.** UBC-859.

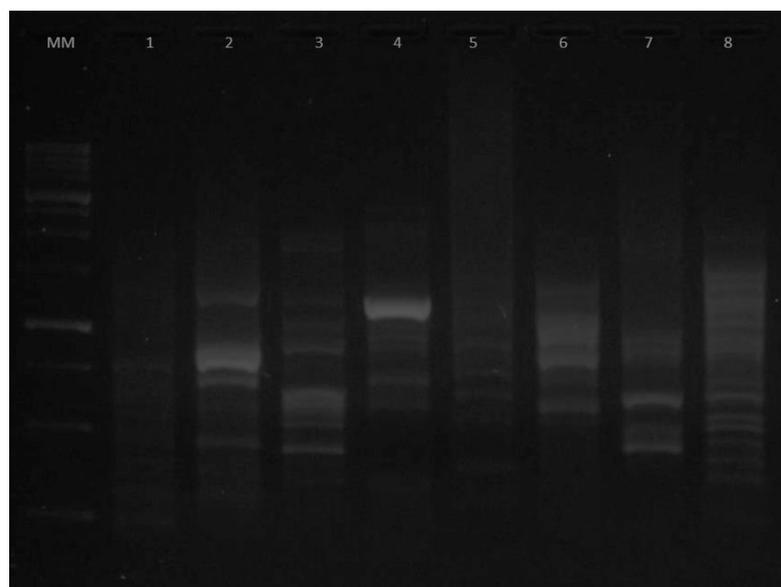


Figura 21. Perfil eletroforético de DNA genômico das plantas matrizes de cana-de-açúcar (var. RB92579) utilizando oligonucleotídeos do tipo ISSR UBC. **MM.** Marcador Molecular 1kb; **1.** ISSR-3; **2.** UBC-866; **3.** UBC-815; **4.** UBC-824; **5.** UBC-826; **6.** UBC-873; **7.** UBC-864; **8.** UBC-868

Os marcadores ISSR selecionados amplificaram um total de 86 bandas, com uma média de 6,6 bandas por primer. Desse total, 36 fragmentos foram polimórficos enquanto 50 foram monomórficos. Dos 13 marcadores ISSR selecionados, o ISSR-866 não apresentou nenhuma banda polimórfica (100% monomórfico), O oligonucleotídeo ISSR-859 apresentou o maior número de bandas polimórficas, 5 bandas de um total de 7 (Tabela 5). Os demais oligonucleotídeos testados não produziram bandas nítidas no gel de agarose 1,5% ou não amplificaram o produto. Dessa forma os marcadores ISSR são potenciais marcadores de

seleção com alta especificidade para a variedade RB92579 de cana-de-açúcar visando estudos de fidelidade genética.

Tabela 5. Oligonucleotídeos do tipo UBC ISSR usados para amplificação do DNA foliar de cana-de-açúcar (variedade RB92579). Ta = temperatura de anelamento. R = (A, G), V = (A, C, G) e Y = (C, T).

ISSR UBC	Sequência (5' → 3')	TA (°C)	Total de bandas amplificadas	Banda monomórficas	Bandas polimórficas
3	GAG GAG GAG GAG GAG GAG	61	8	6	2
810	GAG AGA GAG AGA GAG AT	50	7	5	2
813	CTC TCT CTC TCT CTC TT	50	6	2	4
815	CTC TCT CTC TCT CTC TG	52	8	4	4
817	CAC ACA CAC ACA CAC AA	50	5	4	1
836	AGA GAG AGA GAG AGA GYA	53	9	6	3
848	CAC ACA CAC ACA CAC ARG	55	6	5	1
855	ACA CAC ACA CAC ACA CYT	53	7	3	4
859	TGT GTG TGT GTG TGT GRC	55	7	2	5
864	ATG ATG ATG ATG ATG ATG	47	7	4	3
866	CTC CTC CTC CTC CTC CTC	61	4	4	0
868	GAA GAA GAA GAA GAA GAA	47	7	3	4
873	GAC AGA CAG ACA GAC A	47	5	2	3

Diversos estudos têm sido realizados a fim de selecionar marcadores ISSR eficientes da determinação da fidelidade genética de variedades de cana-de-açúcar comerciais amplamente cultivadas ao longo dos anos como a RB872552, RB931011, RB992587 e RB867515, RB92579, SP791011, SP70- 1143, SP78-4764, RB98710, RB943365, RB763710, RB75126 e RB863129, dentre outras (MELO, 2011; COSTA, et al 2011; SOUZA, 2019). A variedade RB041443 é relativamente recente nos plantios e tem se destacado por possuir características de interesse para região nordeste como aptidão a colheita mecanizada, adaptabilidade e estabilidade fenotípica, tolerância a ambientes de baixa fertilidade e a solos arenosos, enquanto que a variedade RB92579 é uma das variedades mais cultivadas no Nordeste e tem se destacado por possuir características de interesse para região nordeste como: possui alto perfilhamento, ótima brotação da soqueira, maturação média, com alto teor de sacarose e resistência ao déficit hídrico (RIDESA, 2021).

O presente estudo demonstrou que a partir das análises eletroforéticas dos fragmentos amplificados para cada marcador ISSR, não houve variações somaclonais nos subcultivos (1°, 2°, 3°, 4° e 5°) e nas plântulas do BIT, quando comparadas com a planta doadora (RB041443

e RB92579) (Anexos 3-8). O resultado obtido está de acordo com o estudo conduzido por Melo (2011) que avaliou a variação genética da variedade RB872552 de cana-de-açúcar obtidas via micropropagação em BIT e utilizando marcadores ISSR e se observou que não houve diferença no padrão de amplificação para nenhum dos primers utilizados, logo confirmando a fidelidade genética e a ausência de variações somaclonais. Esses resultados diferiram dos resultados obtidos pelo estudo de Martínez-Estrada *et al.* (2017), o qual demonstrou por meio de marcadores ISSR a existência de variações somaclonais nas plântulas micropropagadas de cana-de-açúcar via BIT (var. Mex 69-290), principalmente no 1º, 9º, e 10º subcultivos, concluindo que à medida que o número de subcultivos aumenta, maior é a possibilidade de ocorrer variações somaclonais.

O dendrograma construído pelo método Neighbor-joining, a partir dos marcadores do tipo ISSR, revelou que os indivíduos foram separados em três agrupamentos para ambas as variedades de cana de açúcar (var.RB041443 e RB92579). O primeiro grupo formado por plântulas micropropagadas introduzidas em BIT e pelo clone dos subcultivos 4º e 5º. O segundo grupo é composto pelo clone dos subcultivos 1º e 3º. Já o terceiro grupo é formado pela planta doadora e pelo clone do 2º subcultivo (var.RB041443) (Figura 22). Já para a variedade RB92579, o primeiro grupo foi formado por plântulas micropropagadas introduzidas em BIT e pelo clone dos subcultivos 3º, 4º e 5º. O segundo grupo composto pelo clone dos subcultivos 2º e matriz e o terceiro grupo formado apenas pelo clone do 1º subcultivo (Figura 23).

De acordo com Lal *et al.* (2015) a técnica de micropropagação consiste na produção de plantas idênticas geneticamente às suas plantas matrizes, de tal maneira que a integridade genética da planta doadora seja conservada nas progênes. Os marcadores moleculares do tipo ISSR analisados apresentaram amplificação de fragmentos polimórficos e monomórficos e demonstraram serem eficientes na avaliação da fidelidade genética das plântulas micropropagadas de cana-de-açúcar (var.RB041443 e RB92579), demonstrando baixa dissimilaridade entre os indivíduos, e revelando a eficiência do método de imersão temporária.

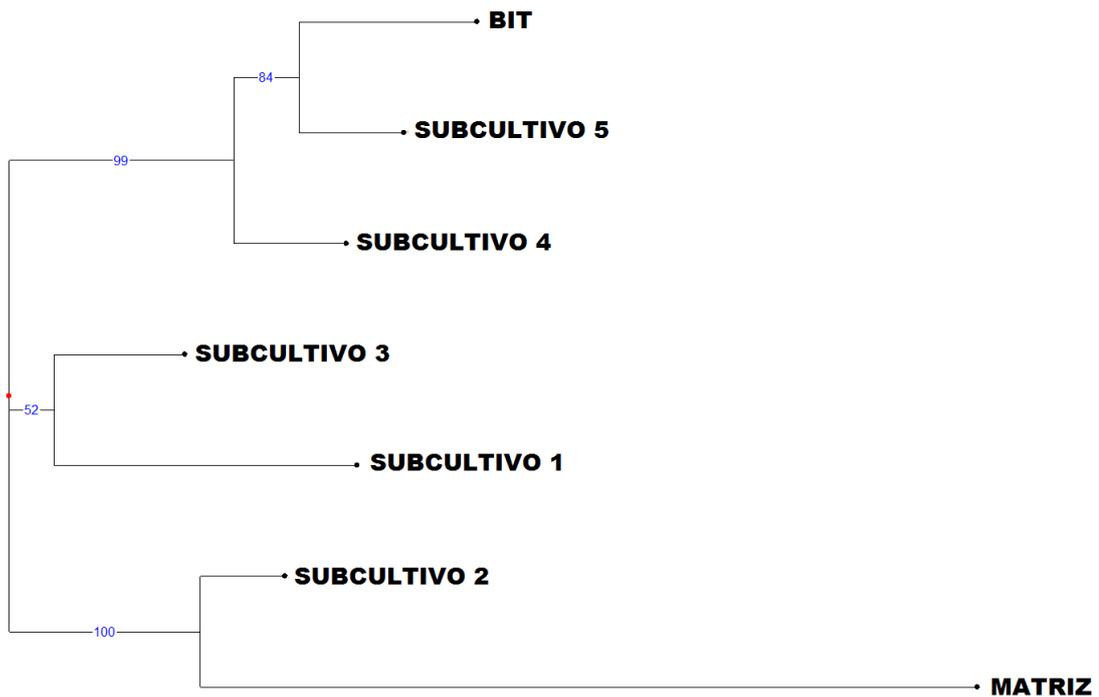


Figura 22. Dendrograma resultante do método de agrupamento de vizinhos (neighbor-joining) baseado na dissimilaridade genética entre cada subcultivo dos clones de cana-de-açúcar em relação à planta matriz (var. RB041443) estimada pelo índice de Jaccard, a partir de marcadores do tipo ISSR.

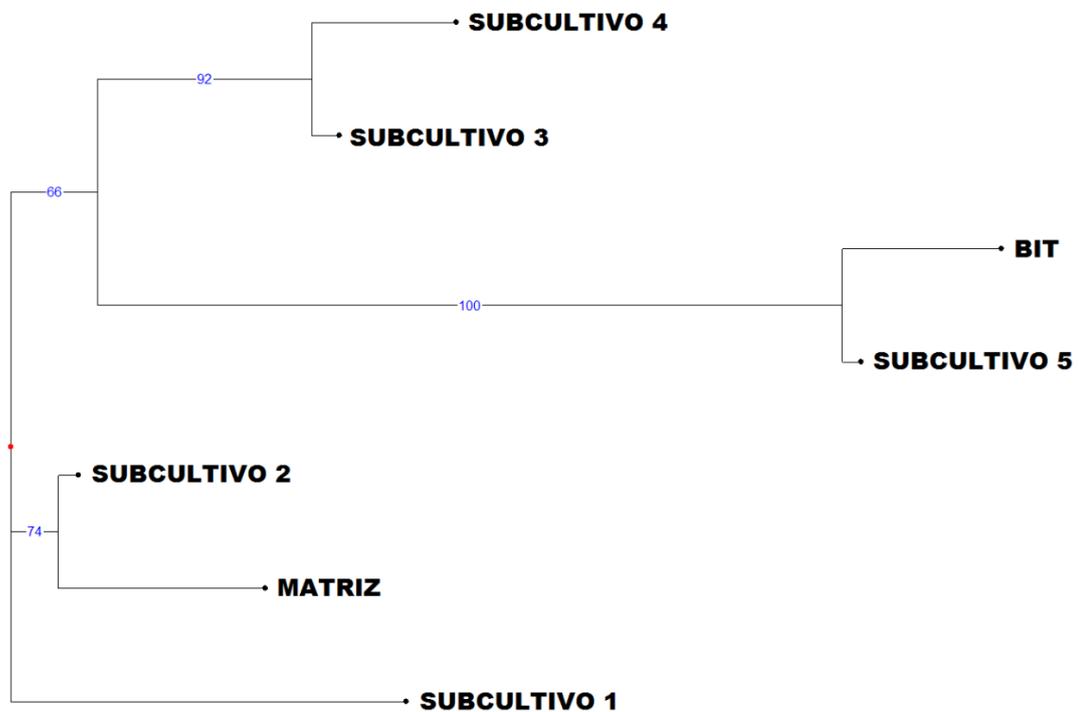


Figura 23. Dendrograma resultante do método de agrupamento de vizinhos (neighbor-joining) baseado na dissimilaridade genética entre cada subcultivo dos clones de cana-de-açúcar em relação à planta matriz (var. RB92579) estimada pelo índice de Jaccard, a partir de marcadores do tipo ISSR.

4.5.4 Análise de fidelidade genética de cana-de-açúcar (variedades RB041443 e RB92579) utilizando marcadores SCoT

O marcador molecular SCoT foi avaliado visando determinar seu potencial uso na área de fidelidade genética de cana-de-açúcar, e assim compor um banco de marcadores moleculares eficientes, reprodutíveis e específicos para as variedades RB041443 e RB92579 de cana-de-açúcar.

Para o marcador molecular do tipo SCoT foram selecionados inicialmente 38 oligonucleotídeos, dos quais 11 apresentaram bandas monomórficas e polimórficas que variaram de 200 a 3000 pb, a partir do DNA genômico da planta matriz de cana-de-açúcar (var. RB041443) oriunda do campo: SCoT-1, SCoT -12, SCoT -13, SCoT -14, SCoT -15, SCoT -21, SCoT -22, SCoT -34, SCoT -35 e SCoT -37, SCoT -39, exibindo qualidade adequada no perfil de eletroforético (Figura 24).

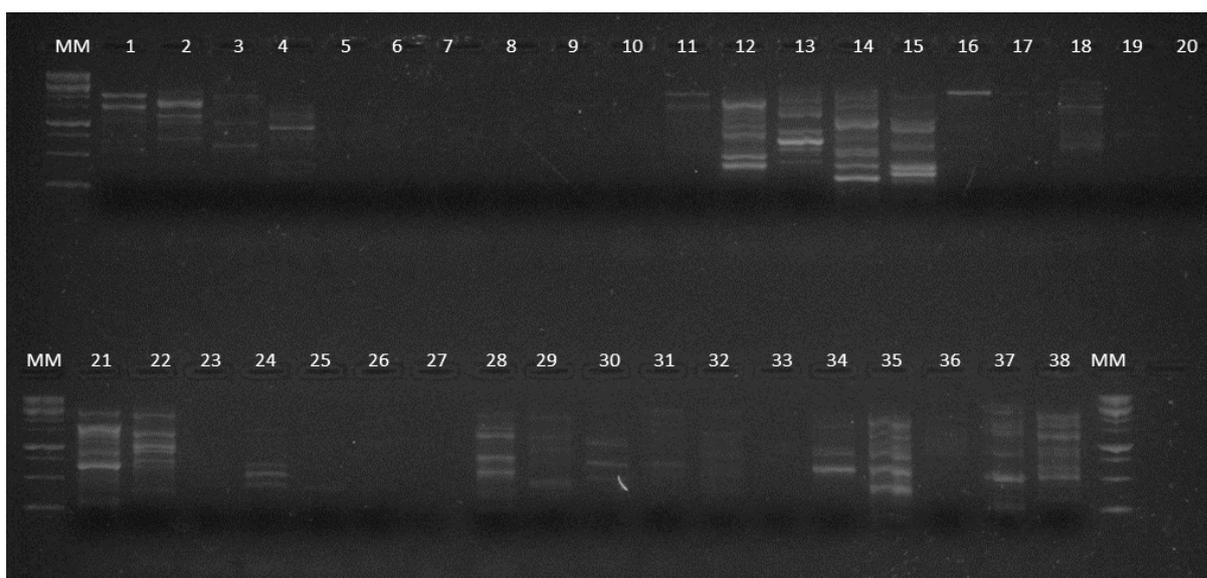


Figura 24. Perfil eletroforético de DNA genômico das plantas matrizes de cana-de-açúcar (var. RB041443) utilizando oligonucleotídeos do tipo SCoT. **MM.** Marcador molecular 1 kb; **1.** SCoT-1, **2.** SCoT-2, **3.** SCoT-3, **4.** SCoT-4, **5.** SCoT-5, **6.** SCoT-6, **7.** SCoT-7, **8.** SCoT-8, **9.** SCoT-9, **10.** SCoT-10, **11.** SCoT-11, **12.** SCoT-12, **13.** SCoT-13, **14.** SCoT-14, **15.** SCoT-15, **16.** SCoT-16, **17.** SCoT-17, **18.** SCoT-18, **19.** SCoT-19, **20.** SCoT-20, **21.** SCoT-21, **22.** SCoT-22, **23.** SCoT-23, **24.** SCoT-24, **25.** SCoT-25, **26.** SCoT-26, **27.** SCoT-27, **28.** SCoT-28, **29.** SCoT-29, **30.** SCoT-30, **31.** SCoT-31, **32.** SCoT-32, **33.** SCoT-33, **34.** SCoT-34, **35.** SCoT-35, **36.** SCoT-36, **37.** SCoT-37, **38.** SCoT-39.

Os marcadores SCoT selecionados amplificaram um total de 84 bandas, com uma média de 7,6 bandas por primer. Desse total, 22 fragmentos foram polimórficos enquanto 62 foram monomórficos. Dos 11 marcadores SCoT selecionados, todos apresentaram banda

monomórfica, enquanto o SCoT -1, SCoT -22 e o SCoT -39 exibiu o mesmo padrão de bandas para todas as amostras analisadas (100 % monomórfico). Além disso, o marcador SCoT -34 é um marcador de seleção com alta especificidade para a variedade RB041443 de cana-de-açúcar visando estudos de fidelidade genética, pois das 6 bandas observadas 4 são polimórficas (Tabela 6).

Tabela 6. Oligonucleotídeos do tipo SCoT usados para amplificação do DNA foliar de cana-de-açúcar (variedade RB041443). Ta = temperatura de anelamento. R = (A, G), V = (A, C, G) e Y = (C, T).

SCoT	Sequência	TA (°C)	Total de bandas amplificadas	Banda monomórficas	Bandas polimórficas
1	CAACAATGGCTACCACCA	55	3	3	0
12	ACGACATGGCGACCAACG	55	9	7	2
13	ACGACATGGCGACCATCG	55	7	6	1
14	ACGACATGGCGACCACGC	61	11	9	2
15	ACGACATGGCGACCGCGA	61	9	6	3
21	ACGACATGGCGACCCACA	55	8	4	4
22	AACCATGGCTACCACCAC	55	5	5	0
34	ACCATGGCTACCACCGCA	55	6	2	4
35	CATGGCTACCACCGGCC	61	10	8	2
37	ACGACATGGCGACCAGCG	61	7	3	4
39	AACCATGGCTACCACCGC	55	9	9	0

Para a variedade RB92579, foram analisados 38 oligonucleotídeos do marcador molecular do tipo SCoT, dos quais 16 apresentaram bandas monomórficas e polimórficas que variaram de 200 a 3000 pb, a partir do DNA genômico da planta matriz de cana-de-açúcar (var. RB92579) oriunda do campo: SCoT-2, SCoT -11, SCoT -12, SCoT -13, SCoT -14, SCoT -15, SCoT -18, SCoT -28, SCoT -29 SCoT -30, SCoT -31, SCoT -32, SCoT -34, SCoT -35 e SCoT -37 e SCoT -39, exibindo qualidade adequada no perfil de eletroforético (Figura 25 e 26).

Os marcadores SCoT selecionados amplificaram um total de 130 bandas, com uma média de 8,1 bandas por primer. Desse total, 20 fragmentos foram polimórficos enquanto 110 foram monomórficos. Dos 16 marcadores SCoT selecionados, todos apresentaram banda monomórfica, enquanto o SCoT -11, SCoT -18, SCoT -30, SCoT -35 e SCoT -37 exibiram o mesmo padrão de bandas para todas as amostras analisadas (100 % monomórfico). Além disso, o marcador SCoT -15 apresentou o maior número de bandas amplificadas e o maior número de bandas polimórficas, ou seja, das 15 bandas observadas 5 são polimórficas (Tabela

7). Os demais oligonucleotídeos testados não produziram bandas nítidas no gel de agarose 1,5% ou não amplificaram o produto.

Tabela 7. Oligonucleotídeos do tipo SCoT usados para amplificação do DNA foliar de cana-de-açúcar (variedade RB92579). Ta = temperatura de anelamento. R = (A, G), V = (A, C, G) e Y = (C, T).

SCoT	Seqüência	TA (°C)	Total de bandas amplificadas	Banda monomórficas	Bandas polimórficas
2	CAACAATGGCTACCACCC	55	7	5	2
11	AAGCAATGGCTACCACCA	55	3	3	0
12	ACGACATGGCGACCAACG	55	7	5	2
13	ACGACATGGCGACCATCG	55	6	5	1
14	ACGACATGGCGACCACGC	61	11	10	1
15	ACGACATGGCGACCGCGA	61	15	10	5
18	ACCATGGCTACCACCGCC	61	7	7	0
28	CCATGGCTACCACCGCCA	61	8	7	1
29	CCATGGCTACCACCGGCC	61	5	4	1
30	CCATGGCTACCACCGGCG	61	5	5	0
31	CCATGGCTACCACCGCCT	61	10	9	1
32	CCATGGCTACCACCGCAC	61	9	8	1
34	ACCATGGCTACCACCGCA	55	6	3	3
35	CATGGCTACCACCGGCC	61	12	12	0
37	ACGACATGGCGACCAGCG	61	12	12	0
39	AACCATGGCTACCACCGC	55	7	5	2

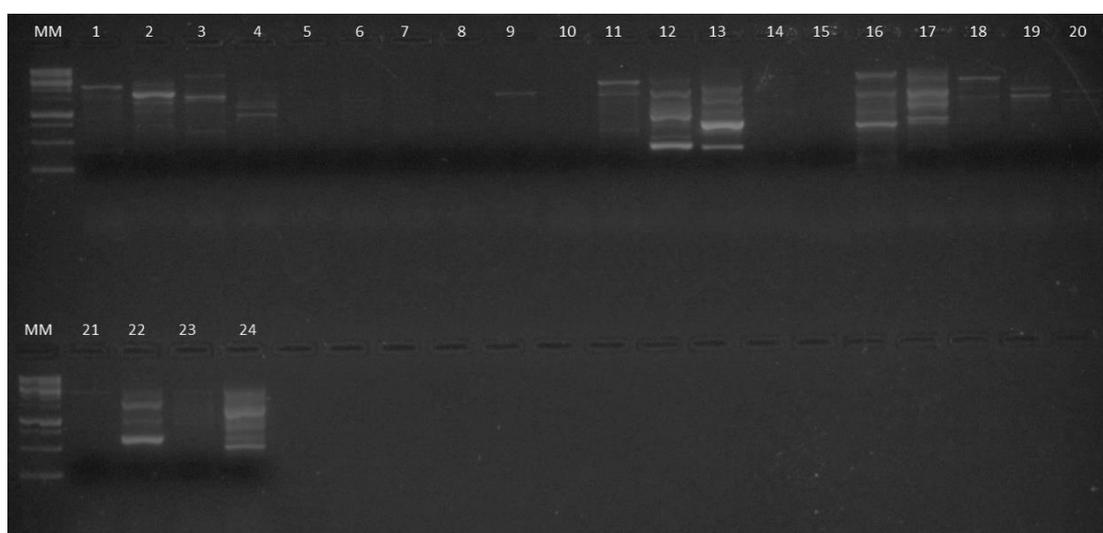


Figura 25. Perfil eletroforético de DNA genômico das plantas matrizes de cana-de-açúcar (var. RB92579) utilizando oligonucleotídeos do tipo SCoT. MM. Marcador molecular 1 kb; 1. SCoT-1, 2. SCoT-2, 3. SCoT-3, 4. SCoT-4, 5. SCoT-5, 6. SCoT-6, 7. SCoT-7, 8. SCoT-8, 9. SCoT-9, 10. SCoT-10, 11. SCoT-11, 12. SCoT-12, 13. SCoT-13, 14. SCoT-16, 15. SCoT-17, 16. SCoT-21, 17. SCoT-22, 18. SCoT-23, 19. SCoT-24, 20. SCoT-26, 21. SCoT-27, 22. SCoT-34, 23. SCoT-36, 24. SCoT-39.

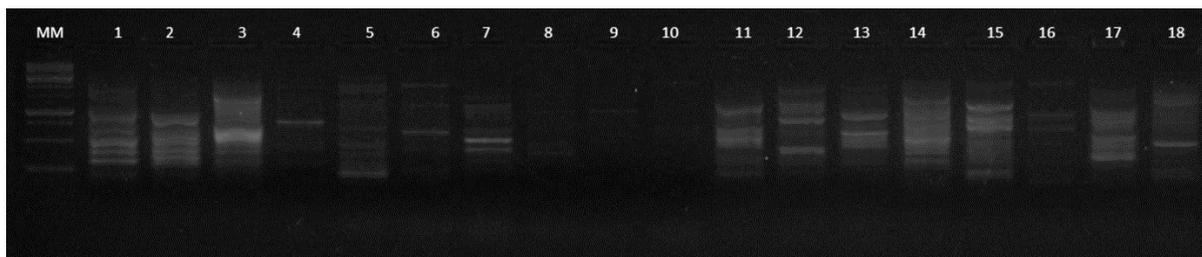


Figura 26. Perfil eletroforético de DNA genômico das plantas matrizes de cana-de-açúcar (var. RB92579) utilizando oligonucleotídeos do tipo SCoT. **MM.** Marcador molecular 1 kb; **1.** SCoT-14, **2.** SCoT-15, **3.** SCoT-18, **4.** SCoT-19, **5.** SCoT-20, **6.** SCoT-23, **7.** SCoT-24, **8.** SCoT-25, **9.** SCoT-26, **10.** SCoT-27, **11.** SCoT-28, **12.** SCoT-29, **13.** SCoT-30, **14.** SCoT-31, **15.** SCoT-32, **16.** SCoT-33, **17.** SCoT-35, **18.** SCoT-37

Alguns estudos têm sido realizados a fim de selecionar marcadores SCoT eficientes na determinação da fidelidade genética, entretanto por ser um marcador relativamente novo, estudos com cana-de-açúcar são escassos. O presente estudo demonstrou que a partir das análises eletroforéticas dos fragmentos amplificados para cada marcador SCoT, não houveram variações somaclonais nos subcultivos (1°, 2°, 3°, 4° e 5°) e nem nas plântulas do BIT, quando comparadas com a planta doadora (var. RB041443 e RB92579) (Anexos 9-13). O resultado obtido está de acordo com o estudo apresentado por Sathish (2018) que avaliou a fidelidade genética por marcadores SCoT a partir de explantes imaturos de enrolamento de folhas de cana-de-açúcar, o qual também observou que não houve diferença no padrão de amplificação para nenhum dos primers utilizados, logo confirmando a fidelidade genética e a ausência de variações somaclonais. O estudo de Clapa (2023) utilizou biorreatores de imersão temporária para micropropagação de *Stevia rebaudiana*, avaliando a fidelidade genética das plântulas cultivadas *in vitro*, utilizando o marcador molecular SCoT. Desta forma, demonstrou que não houve variação somaclonal, pois todos os primers amplificaram bandas monomórficas, confirmando a estabilidade genética das plantas micropropagadas com a matriz.

O dendrograma construído pelo método das análises de agrupamento de vizinhos (Neighbor-joining), a partir dos marcadores do tipo SCoT, revelou que os indivíduos foram separados em três agrupamentos para ambas as variedades. O primeiro grupo formado pelos clones dos subcultivos 1°, 2° e 3°. O segundo grupo é composto por plântulas micropropagadas introduzidas em BIT, pelo clone dos subcultivos 5° e pela matriz. Já o terceiro grupo é formado apenas pelo clone do 4° subcultivo (Figura 27). Já para a variedade RB92579, o primeiro grupo foi formado pelos clones dos subcultivos 1°, 2° e 3°. O segundo grupo é composto por plântulas micropropagadas introduzidas em BIT, pelo clone dos

subcultivos 5° e pela matriz e o terceiro grupo foi formado apenas pelo clone do 4° subcultivo (Figura 28).

Os marcadores moleculares do tipo SCoT analisados apresentaram amplificação de fragmentos polimórficos e monomórficos e demonstraram serem eficientes na avaliação da fidelidade genética das plântulas micropropagadas de cana-de-açúcar (var. RB041443 e RB92579), demonstrando baixa dissimilaridade entre os indivíduos, e revelando a eficiência do método de imersão temporária.



Figura 27. Dendrograma resultante do método de agrupamento de vizinhos (neighbor-joining) baseado na dissimilaridade genética entre cada subcultivo dos clones de cana-de-açúcar em relação à planta matriz (var. RB041443) estimada pelo índice de Jaccard, a partir de marcadores do tipo SCoT.

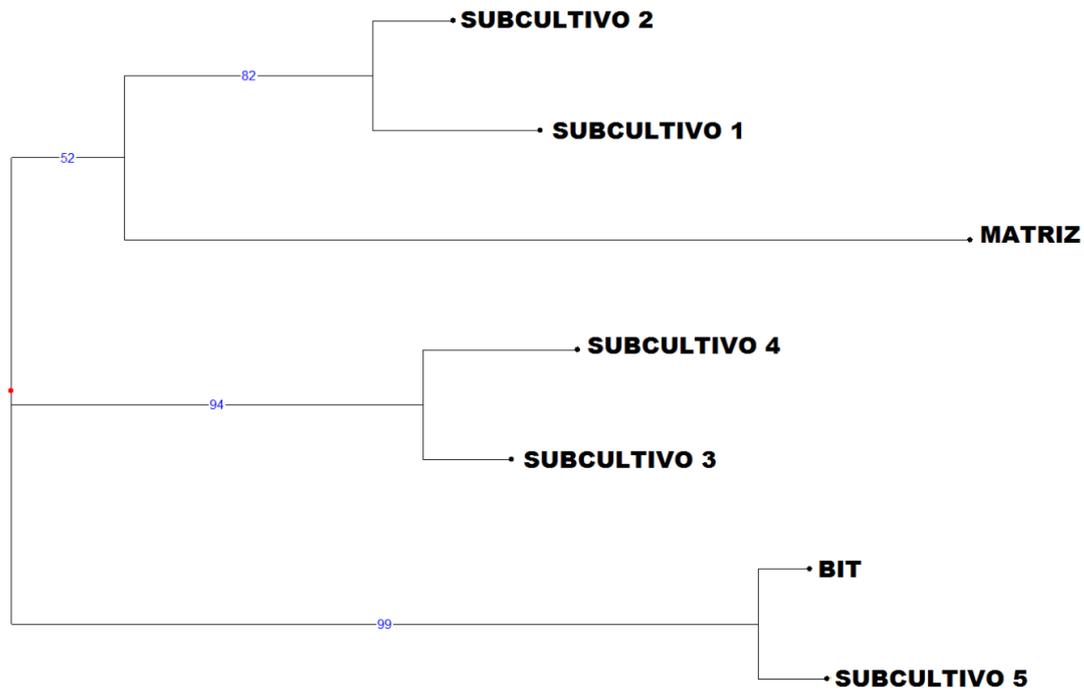


Figura 28. Dendrograma resultante do método de agrupamento de vizinhos (neighbor-joining) baseado na dissimilaridade genética entre cada subcultivo dos clones de cana-de-açúcar em relação à planta matriz (var. RB92579) estimada pelo índice de Jaccard, a partir de marcadores do tipo SCoT.

Segundo Gorji (2011) no trabalho de eficiência de marcadores dominantes (SCoT, ISSR e RAPD) trabalhando com batata (Sweet potato), concluiu que o marcador molecular SCoT foi mais eficiente do que o ISSR. No entanto, no presente trabalho, com base no dendrograma, o ISSR apresentou uma melhor taxa de agrupamento, sendo assim, é possível afirmar que para a cana de açúcar das variedades RB92579 e RB041443 o marcador ISSR foi mais efetivo do que o SCoT.

Ademais, Gorji (2011) informou que pode haver diferenças entre os dendrogramas de marcadores moleculares diferentes, pois a eficiência de cada marcador pode ser explicada por características inerentes a cada um deles como o anelamento em diferentes regiões do genoma, nível de polimorfismo detectado, o número de loci e cobertura do genoma. Desta forma, neste estudo é possível observar que o método de agrupamento (neighbor-joining) dentro desses grupos também não foram semelhantes quando os dendrogramas derivados de ISSR e SCoT são comparados.

Os marcadores ISSR e SCoT selecionados no presente estudo foram eficientes em determinar o perfil molecular (*fingerprinting*) das variedades de cana-de-açúcar variedade

RB92579 e RB1041443. Os marcadores ISSR-810, ISSR-815, ISSR-817, ISSR-848, ISSR-855, ISSR-859 e ISSR-873 amplificaram exclusivamente a variedade RB92579, enquanto os marcadores ISSR-9, ISSR-12, ISSR-19, ISSR-22, ISSR-23, ISSR-24, ISSR-27 e ISSR-29, ISSR-834, ISSR-835, ISSR-844 e ISSR-849 amplificaram exclusivamente a variedade RB1041443. Os marcadores SCoT selecionados para a variedade RB92579 foram o SCoT-2, SCoT -11, SCoT -18, SCoT -28, SCoT -29 SCoT -30, SCoT-31, SCoT-32, enquanto para a variedade RB1041443 foram os marcadores SCoT-1, SCoT-21, SCoT-22.

As análises de fidelidade genética realizada com os subcultivos foram feitas a fim de verificar uma possível variação somaclonal nesta etapa do processo, as quais pudessem influenciar negativamente na etapa final (BIT). A partir do que foi observado concluímos que em trabalhos futuros não se faz necessário uma investigação em níveis de subcultivos uma vez que ao final do processo as plantas obtidas do BIT mantiveram sua integridade genética em relação à planta matriz.

O processo de introdução *in vitro* da variedade RB1041443 de cana-de-açúcar foi eficiente para obtenção de plântulas com fidelidade genética ao comparar as plantas matrizes e mudas obtidas por sistema de imersão temporária (BIT), utilizando os marcadores ISSR e SCoT (Figuras 29 e 30). Para a variedade RB92579 estudos adicionais são necessários a fim de selecionar novos marcadores. Estudos complementares se mostraram necessários a fim de aplicar análises estatísticas aprofundadas para determinar possíveis diferenças genéticas entre os clusters formados.

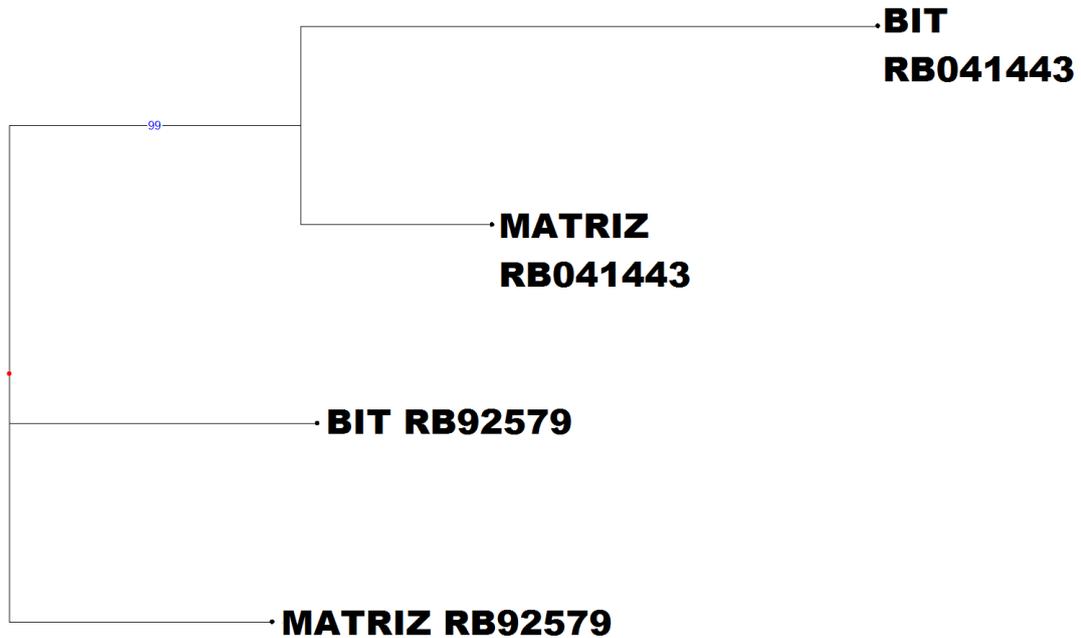


Figura 29. Dendrograma resultante do método de agrupamento de vizinhos (neighbor-joining) baseado na dissimilaridade genética entre matriz e biorreator (var. RB041443 e RB92579) estimada pelo índice de Jaccard, a partir de marcadores do tipo ISSR.

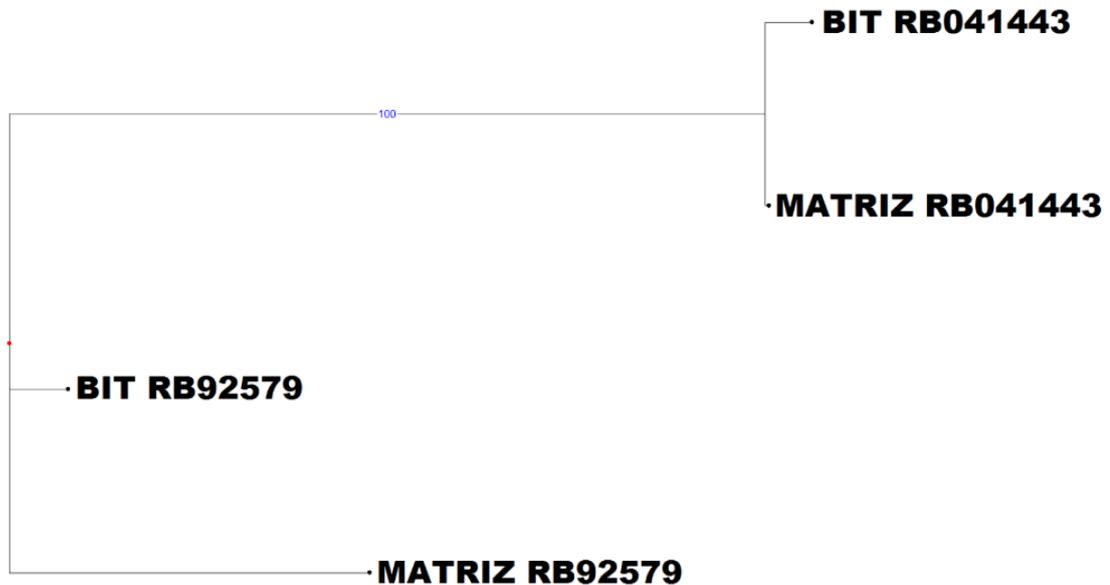


Figura 30. Dendrograma resultante do método de agrupamento de vizinhos (Neighbor-joining) baseado na dissimilaridade genética entre matriz e biorreator (var. RB041443 e RB92579) estimada pelo índice de Jaccard, a partir de marcadores do tipo SCoT.

4.6 Análises bioquímicas

Análises bioquímicas foram realizadas a fim de verificar ocorrência de possíveis variações epigenéticas nas plantas matrizes, subcultivos (1°, 2°, 3°, 4° e 5°) e nas plântulas do BIT, das variedades RB92579 e RB041443 de cana-de-açúcar. Foi realizada a quantificação

de pigmentos fotossintetizantes (clorofila a, b e total, carotenoides), dosagem de proteínas totais e quantificação de enzimas do sistema antioxidante (MDA).

Os teores de pigmentos fotossintetizantes (clorofila a, b e total, carotenoides) são utilizados como um importante indicativo da eficiência na produção de energia da planta e, conseqüentemente, ao crescimento e a capacidade de ajustar, eficaz e rapidamente seu comportamento fisiológico para maximizar a aquisição de recursos a diversos ambientes. Neste trabalho, os pigmentos fotossintetizantes apresentaram variações entre os ambientes de cultivo *in vitro* e matriz para as duas variedades de cana de açúcar (RB041443 e RB92579) (Figura 31 e 32). Os maiores teores de clorofila a, b e total, foi observado nas plantas matrizes, corroborando com os dados encontrados por Mascarenhas (2018) para a *Physalis peruviana* L que observou que os maiores teores de clorofila foram detectados em plantas *ex vitro*.

Ademais, o teor de clorofila b teve um valor significativo, o que pode ser considerado como uma importante adaptação e vantagem para a planta, uma vez que a clorofila b absorve comprimentos de onda diferente da clorofila a (DE SOUZA, 2011). Além disso, a clorofila b e os carotenoides ajudam a captar maior quantidade de luminosidade, pois capturam em outro comprimento de onda, e isso se torna bom para as plantas que estão em condições *in vitro*, pois possuem baixas taxas fotossintéticas proporcionadas por lâmpadas brancas fluorescentes utilizadas em laboratórios de cultura de tecidos de plantas (MARTINS et al., 2010; TAIZ; ZEIGER, 2013). Embora os teores de clorofila e os carotenoides tenham apresentado diferenças estatística nos ambientes matriz e cultivo *in vitro*, os teores produzidos pela cana de açúcar (var. RB041443 e RB92579) cultivadas *in vitro*, demonstrou que esse parâmetro não foi limitante ao funcionamento do aparato fotossintético, pois houve uma alta taxa de sobrevivência e um bom aspecto morfológico das plantas aclimatizadas. O mesmo foi observado no estudo de García-Ramírez et al (2023), o qual avaliou brotos de *Bambusa vulgaris* Schrad. ex Wendl (Bambu; monocotiledônea) em dois sistema de cultivo e constatou que os maiores níveis de teor de clorofila total foram obtidos nos brotos de *B. vulgaris* no TIB. No presente trabalho o maior teor de clorofila foi observado em plantas matrizes, demonstrando que plantas *in vitro* apresentam redução nos teores de clorofila, quando comparadas às plantas aclimatizadas.

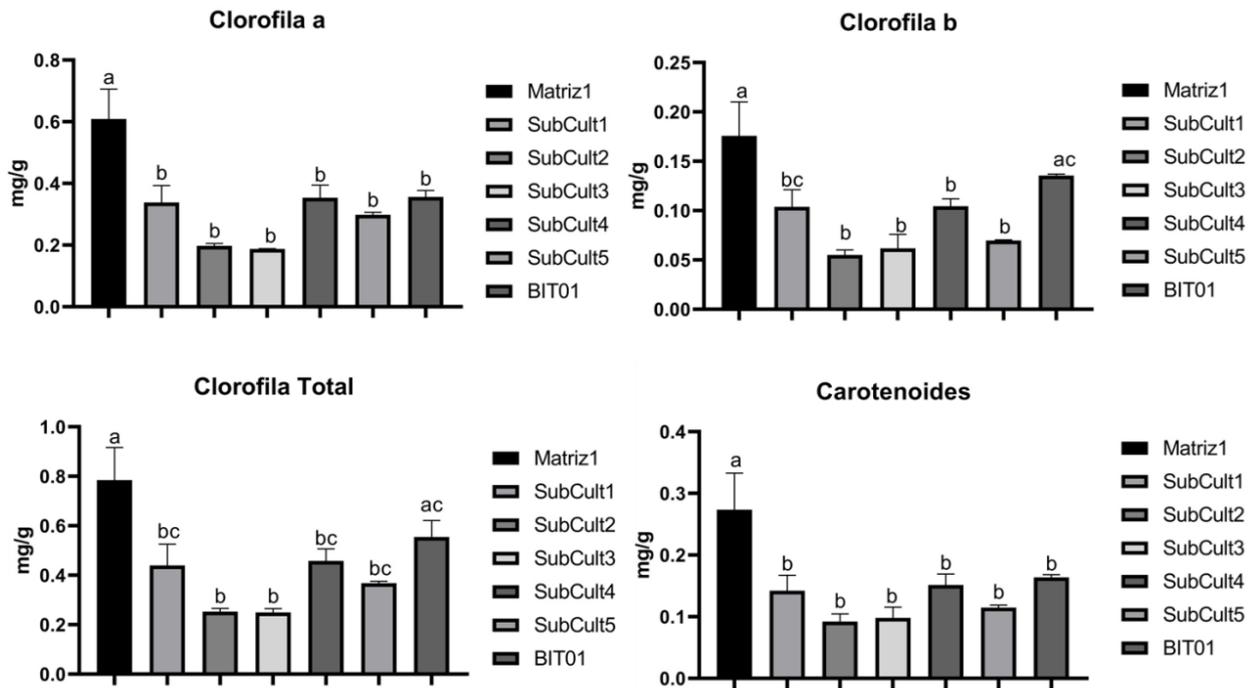


Figura 31. Teores de clorofila a, b, total e carotenoides avaliadas em folhas de Cana de açúcar (var.RB041443) submetidas a planta doadora(campo), clones dos subcultivos (1°,2°,3°,4°,5°) e plântulas introduzidas em sistema de imersão temporária(BIT).

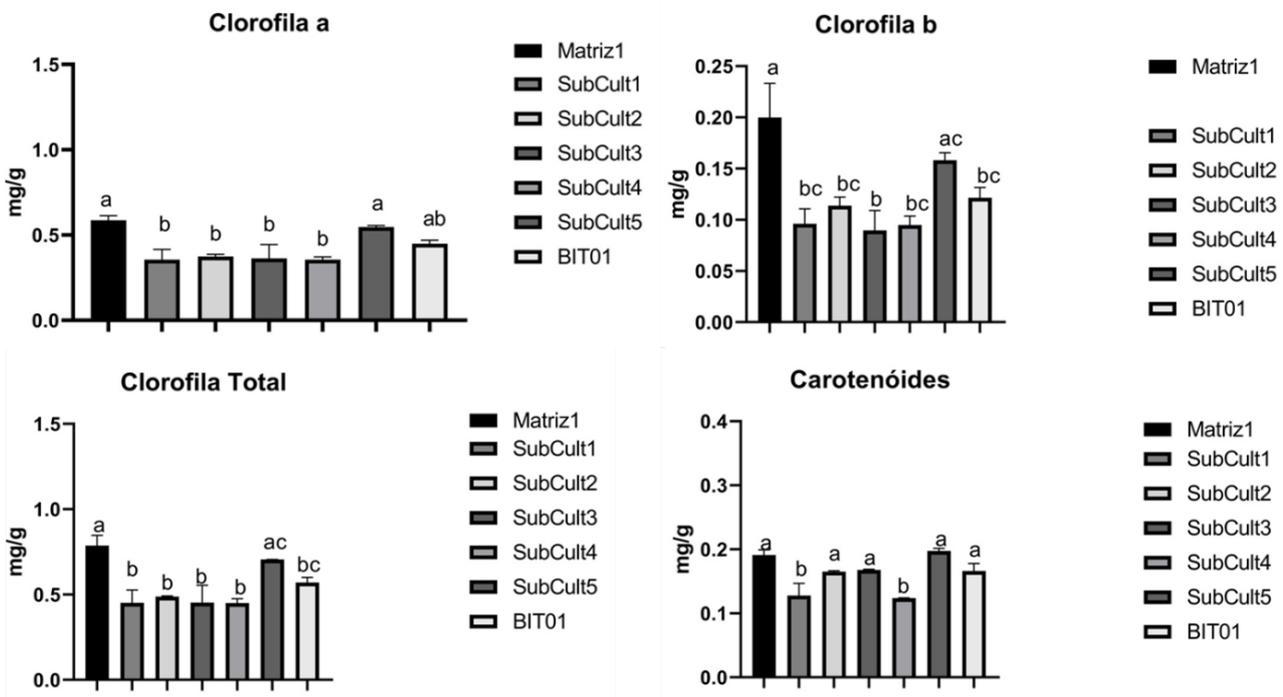


Figura 32. Teores de clorofila a, b, total e carotenoides avaliadas em folhas de Cana de açúcar (var.RB92579) submetidas a planta doadora(campo), clones dos subcultivos (1°,2°,3°,4°,5°) e plântulas introduzidas em sistema de imersão temporária(BIT).

Relatos da literatura demonstram que estresses bióticos ou abióticos induzem o acúmulo de proteínas nas plantas. (MASCARENHAS, 2018). As proteínas desempenham um papel importante no metabolismo (NIEVES et al., 2008). Sendo assim, quanto à dosagem de proteínas solúveis totais, foi demonstrado no presente trabalho, para a var. RB041443 houve diferença estatística das plantas coletadas no BIT em relação a maioria dos subcultivos, esta diferença pode ser explicada pela maior susceptibilidade dos subcultivos aos estresses (MASCARENHAS, 2018) (Figura 33). Além disso, o aumento na concentração de proteínas pode estar relacionado a indução do crescimento tecidual gerado pelo cultivo em biorreatores. Visto que, neste tipo de cultivo o tecido vegetal é imerso em meio de cultura, aumentando a superfície de contato com o tecido vegetal e induzindo o crescimento vegetal. Enquanto a var. RB92579, a concentração de proteínas foi diferencialmente significativa nos subcultivos 1 e 2, no qual as concentrações de proteínas foram inferiores as demais comparações (Figura 34). Tal situação podem estar relacionada as condições do meio de cultivo ocasionando maior susceptibilidade a estresses.

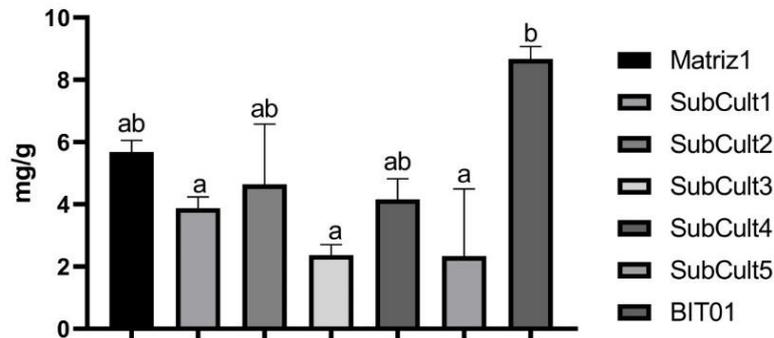


Figura 33. Dosagem de proteínas totais avaliadas em folhas de Cana de açúcar (var. RB041443) submetidas a planta doadora (campo), clones dos subcultivos (1°,2°,3°,4°,5°) e plântulas introduzidas em sistema de imersão temporária(BIT).

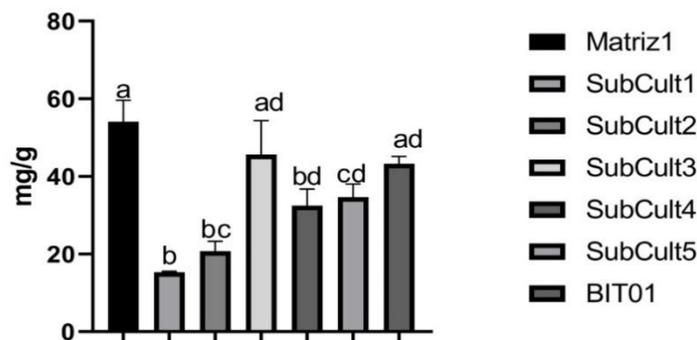


Figura 34. Dosagem de proteínas totais avaliadas em folhas de Cana de açúcar (var. RB92579) submetidas a planta doadora (campo), clones dos subcultivos (1°,2°,3°,4°,5°) e plântulas introduzidas em sistema de imersão temporária(BIT).

O estresse oxidativo ao quais as plantas estão susceptíveis desencadeiam diversos processos, dentre eles a peroxidação lipídica, danificando, destruindo e perturbando as membranas celulares e muitas funções biológicas, isso em decorrência dos danos estruturais de proteínas e ácidos nucleicos. Um dos compostos resultantes desta peroxidação é o malondialdeído (MDA) (ALI & ASHRAF, 2011). Esse composto tem servido como parâmetro na avaliação do nível de danos causados por estresse em diversas plantas submetidas a diferentes estresses bióticos e abióticos, onde o incremento na produção de MDA é indicativo de estresse oxidativo nas células. ((KHAN, 2022; VERMA, 2021; WANG, 2023).

A partir disso, os resultados obtidos dos níveis de MDA, demonstrou um padrão esperado, no qual o maior acúmulo de malondialdeído foi visto em plantas do campo (Figura 33 e 34). Isso ocorre devido a essas plantas estarem sofrendo diversos estresses bióticos e abióticos como: insetos-praga, temperatura e deficiência hídrica, enquanto as plantas introduzidas in vitro, demonstram menor concentração, pois estão em um ambiente controlado. García-Ramírez et al (2023) avaliou brotos de *Bambusa vulgaris* Schrad. ex Wendl (Bambu; monocotiledônea) sob diferentes sistemas de cultivo in vitro, e observou que o cultivo em BIT promoveu menor estresse oxidativo quando comparado a outros sistemas. No presente trabalho o menor estresse oxidativo demonstrado nas plantas in vitro indica que nestas condições ambas as variedades de cana-de-açúcar possuem aparato antioxidante ativo e eficiente, reduzindo possíveis efeitos deletérios que possam estar acometendo as plantas.

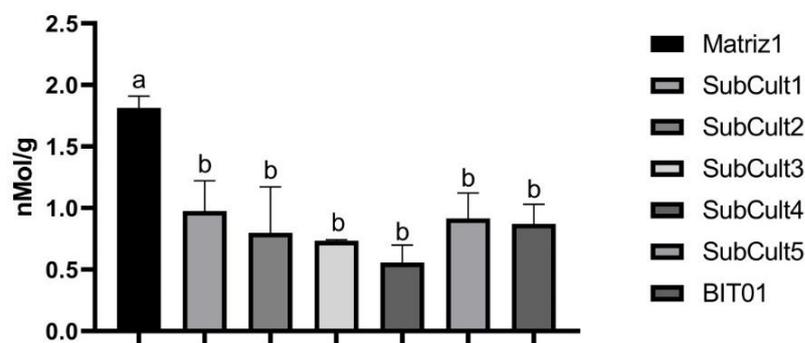


Figura 35. Concentração de MDA avaliadas em folhas de Cana de açúcar (var. RB041443) submetidas a planta doadora (campo), clones dos subcultivos (1°,2°,3°,4°,5°) e plântulas introduzidas em sistema de imersão temporária (BIT).

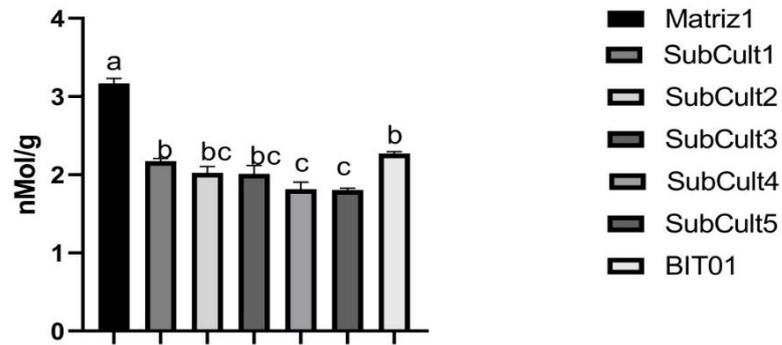


Figura 36. Concentração de MDA avaliadas em folhas de Cana de açúcar (var. RB92579) submetidas a planta doadora (campo), clones dos subcultivos (1°,2°,3°,4°,5°) e plântulas introduzidas em sistema de imersão temporária (BIT).

Diante dos resultados obtidos é possível observar que parâmetros bioquímicos complementam os resultados genéticos uma vez que foi possível revelar variações nas análises de pigmentos fotossintetizantes, MDA e Proteínas totais, mesmo não ocorrendo variação somaclonal nos indivíduos, indicando a necessidade de atenção ao longo do processo de micropropagação por imersão temporária. Estudos adicionais são necessários para avaliar o impacto da epigenética na fidelidade genética da cana-de-açúcar.

5 CONCLUSÃO

- Os Marcadores ISSR-810, ISSR-815, ISSR-817, ISSR-848, ISSR-855, ISSR-859 e ISSR-873 são eficientes em determinar o *fingerprinting* da variedade RB92579 obtida por sistema de imersão temporária (BIT).
- Os Marcadores: ISSR-9, ISSR-12, ISSR-19, ISSR-22, ISSR-23, ISSR-24, ISSR-27 e ISSR-29, ISSR-834, ISSR-835, ISSR-844 e ISSR-849 são eficientes em determinar o *fingerprinting* da variedade RB1041443 obtida por sistema de imersão temporária (BIT).
- Os Marcadores SCoT-2, SCoT -11, SCoT -18, SCoT -28, SCoT -29 SCoT -30, SCoT-31, SCoT-32 são eficientes em determinar o *fingerprinting* da variedade RB92579 obtidas por sistema de imersão temporária (BIT).
- Os Marcadores: SCoT-1, SCoT-21, SCoT-22, são eficientes em determinar o *fingerprinting* da variedade RB1041443 obtidas por sistema de imersão temporária (BIT).
- O processo de introdução *in vitro* das variedades RB1041443 de cana-de-açúcar foi eficiente para obtenção de plântulas com fidelidade genética ao comparar as plantas matrizes e mudas obtidas por sistema de imersão temporária (BIT)
- As análises bioquímicas de pigmentos fotossintetizantes, teor de MDA e proteínas totais indicam que os subcultivos 1 da var. RB92579 e o subcultivo 3 da var. RB041443 requerem maiores atenção durante o processo de micropropagação, porém não influenciam nas etapas subsequentes e não induzem variação somaclonal.

REFERÊNCIAS

- ALI, Q.; ASHRAF, M. Induction of drought tolerance in maize (*Zea mays* L.) due to exogenous application of trehalose: growth, photosynthesis, water relations and oxidative defence mechanism. *J. Agronomy & Crop Science*. p.258-271, 2011.
- AMITEYE, Samuel. Basic concepts and methodologies of DNA marker systems in plant molecular breeding. *Heliyon*, v. 7, n. 10, p. e08093, 2021.
- ARAÚJO, LHA; CARVALHO, JMFC de. Técnicas de cultivo in vitro. **Areia: UFPB/Centro de Ciências Agrárias, Pernambuco**, 2005.
- ATUL BABU, G.; VINOTH, A.; RAVINDHRAN, R. Direct shoot regeneration and genetic fidelity analysis in finger millet using ISSR markers. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 132, p. 157-164, 2018.
- AZEVEDO RA, Carvalho RF, Cia MC and Gratão PL (2011) Sugarcane under pressure: an overview of biochemical and physiological studies of abiotic stress. *Trop Plant Biol* 4:42-51.
- BARBOSA, M.H.P.; RESENDE, M.D.; SILVEIRA, L.C.I.; PETERNELLI, L.A. Estratégias de melhoramento genético da cana-de-açúcar em universidades. In: IX Simpósio sobre seleção recorrente. Lavras: UFLA, 2005
- BARRUETO CID, L. P. A propagação in vitro de plantas. O que é isto? *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*. v. 3, n. 19, p 16-21, 2001
- BASTOS, L.P.; MOREIRA, M.J.S.; COSTA, M.A.P. de C; ROCHA, M.C. da; HANSEN, D. de S.; SILVA, S.A.; DANTAS, A.C V.L.; SOUSA, C. da S. Cultivo in vitro de mangabeira (*Hancornia speciosa*). *Revista Brasileira de Biociências*, v.5, supl.2, p.1122-1124, 2007.
- BENEVIDES, Emilly Anny. **Diversidade genética, conectividade populacional e a conservação do Mero (*Epinephelus itajara*; Perciformes Epinephelidae) na costa atlântica da América do Sul**. 2011. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco.
- BENNICI, A.; ANZIDEI, M.; VENDRAMIN, G. G. Genetic stability and uniformity of *Foeniculum vulgare* Mill. regenerated plants through organogenesis and somatic embryogenesis. *Plant Science*, v. 166, p. 221-227, 2004
- BORÉM, A. Melhoramento de plantas. Viçosa : UFV, 1997. 547p
- BORNET, B.; BRANCHARD, M. Nonanchored inter simple sequence repeat (ISSR) markers: reproducible and specific tools for genome fingerprinting. *Plant molecular biology reporter*, v. 19, p. 209-215, 2001.
- BRITTO .F.F. Análise da divergência genética por marcadores issr em *Passiflora trinitae* Sacco, 2017.
- CANELA, Felipe Mont'Alvão. Similaridade genética entre acessos de *Mentha* utilizando marcadores ISSR e RAPD. 2016.
- CARVALHO, L. S. O.; OZUDOGRU, A.; LAMBARDI, M.; PAIVA, L. V. Temporary immersion system for micropropagation of tree species: a bibliographic and systematic review. *Notulae Botanicae Horti Souza et al. Nativa, Sinop*, v. 10, n. 1, p. 117-124, 2022. *123 Agrobotanici Cluj-Napoca*, v. 47, n. 2, p. 269-277, 2019.
- CARVALHO, W. V. **Variação fenotípica em *Curatella americana* L. (Dilleniaceae) em tipologias abertas da Amazonia**. Dissertação (Mestrado) - Programa de PÓS-GRADUAÇÃO em Ciências Biológicas (CB), Campus Universitário de Belém, Universidade Federal Rural Da Amazônia, Belém, 122 f. : il. Color, 2020.
- CASAGRANDE, A. A. Tópicos de morfologia e fisiologia de cana-de-açúcar. Jaboticabal: FUNEP. 1991. 157 p.
- CESNIK, R.; MIOCQUE, J. Melhoramento da cana-de-açúcar. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 307pp, 2004
- CHANNARAYAPPA. *Molecular biotechnology: principles and practices*. Bangalore: Universities Press, 2007. 1217 p.

CIB. Guia da Cana-de-açúcar: avanço científico beneficia o país. Conselho de Informações sobre Biotecnologia. 2009. 20p.

CLAPA, Doina et al. EVALUATION OF BIOMASS PRODUCTION OF STEVIA REBAUDIANA BERTONI USING CLASSICAL IN VITRO CULTURE AND TEMPORARY IMMERSION BIOREACTOR SYSTEM. *Scientific Papers. Series B. Horticulture*, v. 67, n. 1, 2023.

COLLARD, BCY, Mackill, DJ Start Polimorfismo direcionado por códon (SCoT): uma técnica simples e nova de marcador de DNA para geração de marcadores direcionados a genes em plantas. *Planta Mol Biol Rep* **27**, 86–93 (2009).

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTCIMENTO. Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar, Brasília, DF, v. 11, n. 3, novembro 2023

COSTA. M.L.M, AMORIM.B.L.L, ONOFRE.C.V.A, MELO.T.O.J.L, OLIVEIRA.M.B.M, CARVALHO.R,ISEPPON.B.M. A Assessment of Genetic Diversity in Contrasting Sugarcane Varieties Using Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) Markers. *American Journal of Plant Sciences*, 2011, 2, 425-432, doi:10.4236/ajps.2011.23048.

DE SOUZA, Girlene Santos et al. Teores de pigmentos fotossintéticos, taxa de fotossíntese e estrutura de cloroplastos de plantas jovens de *Mikania laevigata* Schultz Bip. ex Baker cultivadas sob malhas coloridas. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 32, n. 4Sup1, p. 1843-1854, 2011

DUTRA FILHO, João de Andrade. Avaliação da variabilidade fenotípica e genética em genótipos de cana-de-açúcar utilizando marcadores moleculares RAPD e SSR. 2010. 154 f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Melhoramento Genético de Plantas) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife

EMBRAPA. Análise quantitativa em crescimento de cana-de-açúcar: uma introdução ao procedimento prático. Aracajú: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2012. 29 p. (Documentos, 168).

EMBRAPA. Fatores inerentes À Micropropagação. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2006. 28p. (Documentos, 148).

ESCALONA, M. et al. Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr) micropropagation in temporary immersion systems. *Plant cell reports*, v. 18, p. 743-748, 1999.

FACHINELLO, José Carlos et al. **Propagação de plantas frutíferas**. Brasília: EMBRAPA informação tecnológica, 2005.

FAO (2019) World food and agriculture statistical pocketbook 2019.

FERNANDEZ-GARCIA, N. et al. ROS as biomarkers of hiperhydricit. In: GUPTA, D. **Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants** London Local: Sciences Publishers, 2011. Cap.12, p.249-272.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 2 ed. Brasília: Embrapa-Cenargen, 1998. 220

FERREIRA, ME; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética . 3.ed. Brasília: Embrapa Cenargen, 2008. 220p. (Embrapa Cenargen. Documentos, 20).

FIGUEIREDO, P. Breve história da cana de açúcar e do papel do instituto agrônômico no seu estabelecimento no Brasil. In: DINARDO-MIRANDA, L. L.; VANCONCELOS, A. C. M.; LANDELL, M. G. A. Cana-de-Açúcar: Instituto Agrônômico, 2008. 882 p.

FIGUEIREDO. P, Landell MGA, Campana MP (1995) Cana-de-açúcar. 6ª Edição. Campinas: IAC (IAC. Boletim 200).

FREITAS, L. B. e Bered, F. (orgs.). Genética e evolução vegetal. Porto Alegre Editora da UFRGS, 2003. 463 p

GARCÍA-Ramírez, Y., Barrera, GP, Freire-Seijo, M. *et al.* Alterações anatômicas e bioquímicas de brotos de *Bambusa vulgaris* Schrad. ex Wendl sob diferentes sistemas de cultivo in vitro de brotos. *Braz. J. Bot* **46**, 815–822 (2023).

- GASPAR, T. et al. *In vitro* plant recalcitrance loss of plant organogenic totipotency in the course of *in vitro* neoplastic progression. ***In vitro Cellular & Developmental Biology - Plant***, v.36, p.171-181, 2000
- GILL, S. S.; TUTEJA, N. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*. v. 48:909 – 930.
- GORJI, A.M., Poczai, P., Polgar, Z. et al. Efficiency of Arbitrarily Amplified Dominant Markers (SCOT, ISSR and RAPD) for Diagnostic Fingerprinting in Tetraploid Potato. *Am. J. Pot Res* **88**, 226–237 (2011).
- JUNG, Woo-Suk et al. Direct shoot organogenesis from *Lycium chinense* Miller leaf explants and assessment of genetic stability using ISSR markers. ***Agronomy***, v. 11, n. 3, p. 503, 2021.
- KANWAR, K., Bindiya, K. Random amplified polymorphic DNA (RAPDs) markers for genetic analysis in micropropagated plants of *Robinia pseudoacacia* L.. *Euphytica* 132, 41–47 (2003).
- KELLOGG EA (2013) C4 photosynthesis. *Curr Biol* 23:R594–R599. doi: 10.1016/j.cub.2013.04.066
- KHAN, Imran et al. Mitigation of salinity-induced oxidative damage, growth, and yield reduction in fine rice by sugarcane press mud application. ***Frontiers in Plant Science***, v. 13, p. 840900, 2022.
- KROES, S.; HARRIS, H.D. Knockdown causes major damage to cane during harvesting. In: AUSTRALIAN SOCIETY OF SUGAR CANE TECHNOLOGISTS CONFERENCE, 18., 1996, Mackay. Proceedings... Brisbane: Watson Ferguson, 1996. p. 137-44.
- KORDROSTAMI, M., Rahimi, M., 2015. Marcadores moleculares em plantas: conceitos e formulários. In: Paper apresentado na Conferência sobre Genética no Terceiro Milênio, 13, pp. 4024-4031.
- LAL, Mandan; TIWARI, A. K.; GUPTA, G. N. Commercial scale micropropagation of sugarcane: constraints and remedies. ***Sugar Tech***, v. 17, n. 4, p. 339-347, 2015.
- LANGDALE JA (2011) C 4 Cycles: Past, Present, and Future Research on C 4 Photosynthesis. *Plant Cell* 23:3879–3892. doi: 10.1105/tpc.111.092098
- LARKIN, P.J.; SCOWCROFT, W.R. Somaclonal variation – a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theoretical and Applied Genetics*, v.60, p.197-214, 1981.
- LEMOES, E. E. P. D., FERREIRA, M. D. S., ALENCAR, L., OLIVEIRA, J. G. L., & MAGALHÃES, V. S. (2001). Micropropagação de clones de banana cv. Terra em biorreator de imersão temporária. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 23, 482-487.
- LIMA, G. P. P. et al. Polyamines, Gelling Agents in Tissue Culture, Micropropagation of Medicinal Plants and Bioreactors. In: LEVA, A. (Ed.). *Recent Advances in Plant in vitro Culture*. [s.l: s.n., 2011].
- MARIN, Fabio Ricardo. Fenologia. Embrapa, 2022
- MARTÍNEZ-ESTRADA, E. et al. Assessment of somaclonal variation during sugarcane micropropagation in temporary immersion bioreactors by inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. ***In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant***, v. 53, n. 6, p. 553-560, set. 2017.
- MARTINS, J. R. et al. Teores de pigmentos fotossintéticos e estrutura de cloroplastos de Alfavaca-cravo cultivadas sob malhas coloridas. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 40, n. 1, p. 64-69, 2010
- MASCARENHAS, Lilian Marcia Santana. Micropropagação e análises bioquímica e fitoquímicas de *Physalis peruviana* L. Dissertação de mestrado, Universidade estadual de feira de Santana, 2018.
- MELO, Gemima Manço de et al. Instabilidade fenotípica na variedade RB872552 de cana-de-açúcar: marcadores ISSR e enzimas do sistema antioxidativo. 2011.
- MORAIS LK, de Aguiar MS, de Albuquerque e Silva P, Câmara TMM, Cursi DE, Júnior ARF, Chapola RG, Carneiro MS and Bespalhok Filho JC (2015) Breeding of Sugarcane. In: Cruz VMV and Dierig DA (eds) *Industrial Crops*. Springer New York, New York, NY, pp 29–42

MORAES.R.E; Aguilar.S.A; Machado.M.L.D; Campos D.M.A , Asmar A.S , Luz Q.M.J. MICROPROPAGAÇÃO DA CANA-DE-AÇÚCAR. Goiás, Brasil: Colloquium Agrariae, vol. 13, n. Especial, Jan–Jun, 2017, p. 32

MURASHIGE T & Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-97, 1962.

NACHILUK, Katia. Alta na Produção e Exportações de Açúcar Marcam a Safra 2020/21 de Cana. **Publicado por: Análises e Indicadores do Agronegócio, São Paulo**, v. 16, n. 6, p. 1-5, 2021.

NASSER, Haidy et al. EMS-mutagenesis, In vitro Selection for Drought (PEG) Tolerance and Molecular Characterization of Mutants in Rice (*Oryza sativa* L.) Employing qRT-PCR and ISSR Markers. **Egyptian Journal of Botany**, v. 64, n. 1, p. 87-105, 2024

NG, W.L.; Tan, S.G. Inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. *ASM Science Journal*, v. 9, n.1, p. 30-39, 2015.

NIEVES N, Sagarra F, González R, Lezcano Y, Cid M, Blanco MA, Castillo R. Effect of exogenous arginine on sugarcane (*Saccharum* sp.) somatic embryogenesis, free polyamines and the contents of the soluble proteins and proline. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*; 2008;95;313-320.

OLIVEIRA, Ricardo Augusto de Liberação nacional de variedades RB de cana-de-açúcar. / Ricardo Augusto de Oliveira, Hermann Paulo Hoffmann, Geraldo Veríssimo de Souza Barbosa (Orgs.). – Curitiba: UFPR. RIDESA, 2021. 79 p.: il. Co

OLIVEIRA, R. A.; BARBOSA, G. V. S.; DAROS, E. 50 anos de Variedades "RB" de Cana-de-açúcar: 30 anos de RIDESA. Curitiba: UFPR. RIDESA, 2021a. 199 p.

OLIVEIRA, A. L. B.; FERREIRA, L. T.; HERCULANO, L.; OLIVEIRA, R. A.; PEREIRA, J. A. F.; CAMARA, T. R. Ação do hipoclorito na assepsia de explantes de cana-de-açúcar para embriogênese somática. In: JORNADA DE ENSINO, PESQUISA E EX TENSÃO DA UFRPE ,10 ., 2010, Recife. Anais... Recife: Editora da UFRPE, 2010. JEPEX. R0720-1.

OROZCO-ORTIZ, Cristofer et al. BIT® bioreactor increases in vitro multiplication of quality shoots in sugarcane (*Saccharum* spp. variety LAICA 04-809). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 152, n. 1, p. 115-128, 2023

PAWEŁKOWICZ et al., 2021 M.E. Pawełkowicz, A. Skarzyńska, T. Mróz, E. Bystrzycki, W. Piłder Molecular insight into somaclonal variation phenomena from transcriptome profiling of cucumber (*Cucumis sativus* L.) lines *Plant Cell, Tissue Organ Cult. (PCTOC)* (2021), 10.1007/s11240-020-02005-yBENNICI, A.; ANZIDEI, M.; VENDRAMIN, G. G. Genetic stability and uniformity of *Foeniculum vulgare* Mill. regenerated plants through organogenesis and somatic embryogenesis. *Plant Science*, v. 166, p. 221-227, 2004

QUE, Y., Pan, Y., Lu, Y., Yang, C., Yang, Y., Huang, N., & Xu, L. Genetic Analysis of Diversity within a Chinese Local Sugarcane Germplasm Based on Start Codon Targeted Polymorphism *Pesquisa BioMed internacional*, 2014 .

RAI MK. Start codon targeted (SCoT) polymorphism marker in plant genome analysis: current status and prospects. *Planta*. 2023 Jan 9;257(2):34.

RAJPUT, B. S. *et al.* Large-scale clonal propagation of *Bambusa balcooa* Roxb.: an industrially important bamboo species. **Industrial Crops and Products**, v. 157, n. 112905, p. 1-11, dez. 2020.

RAMAKRISHNAN, M. et al. Efficient plant regeneration from shoot apex explants of maize (*Zea mays*) and analysis of genetic fidelity of regenerated plants by ISSR markers. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 119, p. 183-196, 2014.

RAMOS, C. R. G.; LANÇAS, K. P.; SANDI, J.; LYRA, G. A.; MILLANI, T. M. QUALIDADE DO CORTE DOS REBOLOS NA COLHEITA MECANIZADA DA CANA-DE-AÇÚCAR EM DIFERENTES CONDIÇÕES OPERACIONAIS. **ENERGIA NA AGRICULTURA**, [S. l.], v. 30, n. 3, p. 217–224, 2015. DOI: 10.17224/EnergAgric.2015v30n3p217-224

RAO, Vivekanand P. et al. Genetic variability in sugarcane (*Saccharum* spp. hybrid) genotypes through inter simple sequence repeats (ISSR) markers. *Journal of Applied and Natural Science*, v. 8, n. 3, p. 1404-1409, 2016.

RÊGO, Gizelda Maia; Possamai, Edilberto . Avaliação dos Teores de Clorofila no Crescimento de Mudanças do Jequitibá-Rosa (*Cariniana legalis*). Embrapa. Dezembro, 2004.

SAMBOLÍN Pérez, CA, Aybar Batista, R., Morales Marrero, S., Andino Santiago, D., Reyes Colón, A., Negron Berrios, JA, Núñez Marrero, A., & Arun, A. (2023). Caracterização Bioquímica e Molecular de *Musa* sp. Cultivado em Biorreator de Imersão Temporária. Pré-impresões. <https://doi.org/10.20944/preprints202301.0117.v1>

SANTANA, I. B. B.; Oliveira, E. J.; Soares Filho, W. S.; Ritzinger, R.; Amorim, E. P.; Costa, M. A. P. C.; Moreira, R. F. C. Variabilidade genética entre acessos de umbu-cajazeira mediante análise de marcadores ISSR. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 33, n. 3, p. 868-876, 2011.

SATHISH, D., Vasudevan, V., Thebora, J. *et al.* Regeneração direta eficiente de plantas a partir de explantes imaturos de enrolamento de folhas de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) utilizando poliaminas e avaliação da fidelidade genética por marcadores SCoT. *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant* **54** , 399–412 (2018).

SERAFIM, L. G. F. et al. Influência do plantio mecanizado no índice de brotação da cana de açúcar. *Stab*, v. 31, p. 22-25, 2013.

SERROTE, Caetano Miguel Lemos et al. Determining the Polymorphism Information Content of a molecular marker. *Gene*, v. 726, p. 144175, 2020.

SHARAFI, A., Abkenar, A., Sharafi, A., 2017. Evaluation of molecular genetic diversity of citrus species cultivated in Iran revealed by molecular markers SSR, ISSR and CAPS. **Journal of Science and Research: Revista Ciencia e Investigación**, v. 2, n. 8, p. 22-27, 2017.

SHINGOTE, PR, Amitha Mithra, SV, Sharma, P. *et al.* Retrotransposons LTR e ISSRs altamente informativos combinados são marcadores potenciais para testes de fidelidade genética de plantas cultivadas em cultura de tecidos em cana-de-açúcar. *Reprodução Mol* **39** , 25 (2019)

SILVA, JA, Solis-Gracia, N., Jifon, J. *et al.* Utilização de biorreatores para multiplicação em larga escala de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.), cana-energia (*Saccharum* spp.) e espécies relacionadas. *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant* **56** , 366–376 (2020).

SONGPO Liu, Yuxuan Wang, Yuwei Song, Majid Khayatnezhad, Amir Abbas Minaeifar (2021) Genetic variations and interspecific relationships in Salvia (Lamiaceae) using SCoT molecular markers. *Caryologia* 74(3): 77-89.

SOUZA GM, Van Sluys M-A, Lembke CG, Lee H, Margarido GRA, Hotta CT, Gaiarsa JW, Diniz AL, Oliveira M de M, Ferreira S de S et al. (2019) Assembly of the 373k gene space of the polyploid sugarcane genome reveals reservoirs of functional diversity in the world's leading biomass crop. *GigaScience* 8:giz129. doi: 10.1093/gigascience/giz129

SOUZA, Pedro Henrique Neves de et al. Estudo genealógico e variáveis biométricas, bioquímicas e agroindustriais de genótipos de cana-de-açúcar sob diferentes condições hídricas. 2019.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Fisiologia vegetal*. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 918 p.

TAKAYAMA, S.; AKITA, M. The types of bioreactors used for shoots and embryos. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, New York, v. 39, n. 2, p. 147-156, 1994.

TEIXEIRA, J. B. - Produção de mudas clonais em biofábricas e uso de biorreator. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. 2006.

TETTI, L. Vantagens da cana. 2002.

THORPE, T. History of plant tissue culture. *Methods in Molecular Biology*, Totowa, v.877, p.9-27, 2012.

UMA, Subbaraya et al. Evaluation of temporary immersion bioreactors for in vitro micropropagation of banana (*Musa spp.*) and genetic fidelity assessment using flow cytometry and simple-sequence repeat markers. **South African Journal of Botany**, v. 157, p. 553-565, 2023.

UNICA - UNIAO AGROINDUSTRIA CANAVIEIRA DE SAO PAULO. Estatísticas. São Paulo: União da Agroindústria Canavieira de São Paulo, 2006.

VERMA, Krishan K. et al. Foliar application of silicon boosts growth, photosynthetic leaf gas exchange, antioxidative response and resistance to limited water irrigation in sugarcane (*Saccharum officinarum L.*). **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 166, p. 582-592, 2021.

WACLAWOVSKY, Alessandro J. et al. Sugarcane for bioenergy production: an assessment of yield and regulation of sucrose content. **Plant Biotechnology Journal**, v. 8, n. 3, p. 263-276, 2010.

WANG, Rui et al. Integrated flow cytometric and proteomics analyses reveal the regulatory network underlying sugarcane protoplast responses to fusion. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 202, p. 107918, 2023.

WENDLING, Ivar. Propagação vegetativa. **SEMANA DO ESTUDANTE**, 2003.

ZIV, M.; CHEN, J. VISHNEVETSKY, J. Propagation of Plants in Bioreactors: Prospects and Limitations. In: ECONOMOU, A.S.; READ, P.E. (Eds) Proc 1^a IS on Accl. & Estab. Microprop. Plants, Acta Horticulturae. v. 616, p.85-93, 2003.

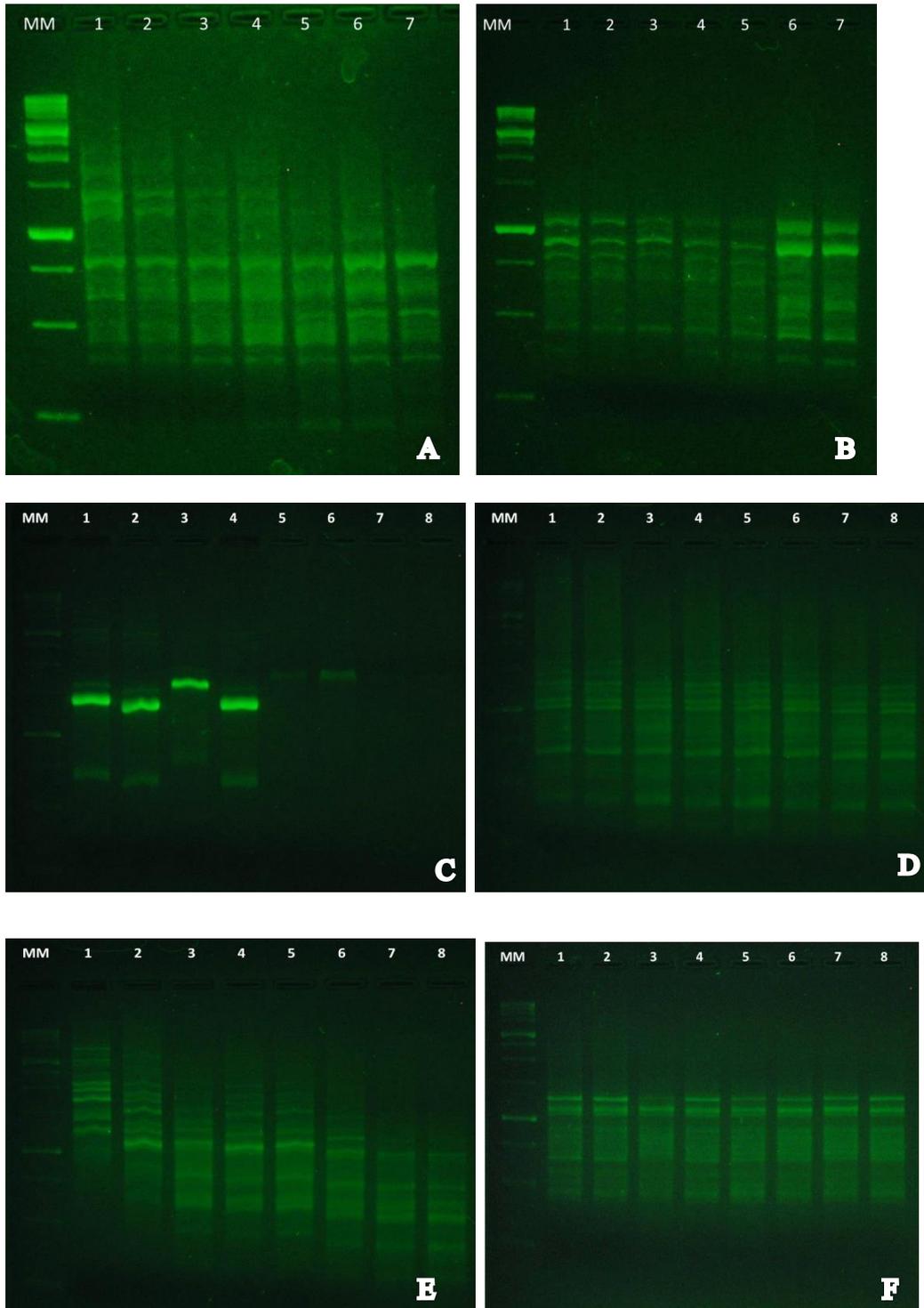
ANEXOS

Anexo 1. Tabela de todos os 38 primers testados do tipo UBC ISSR.

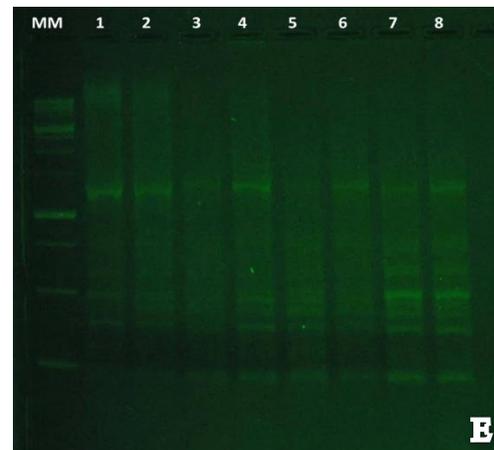
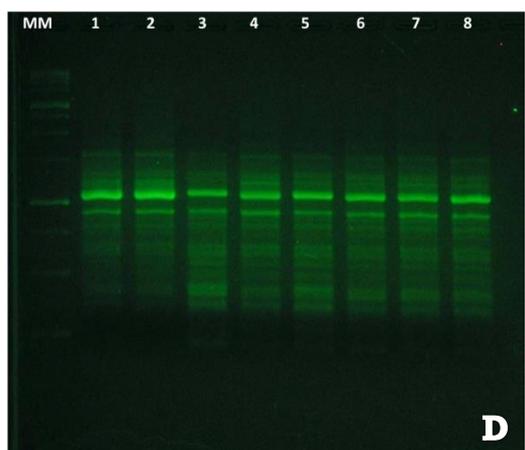
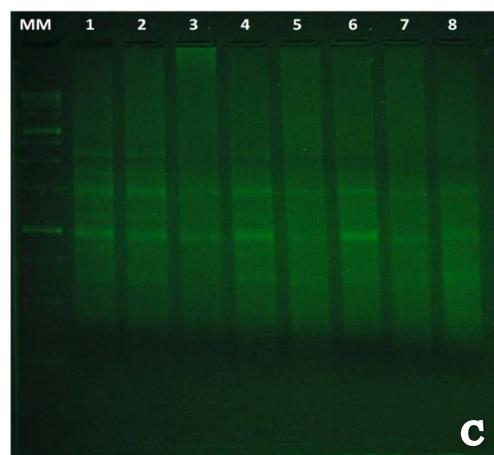
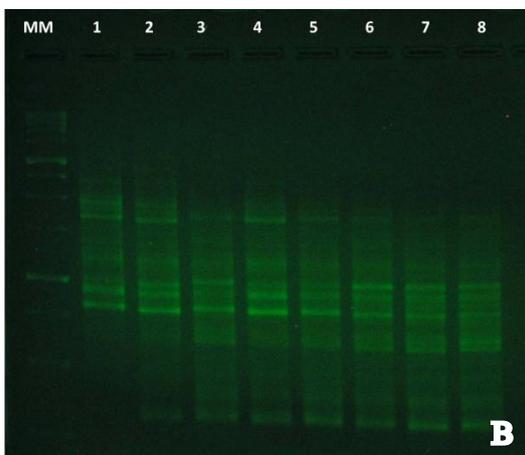
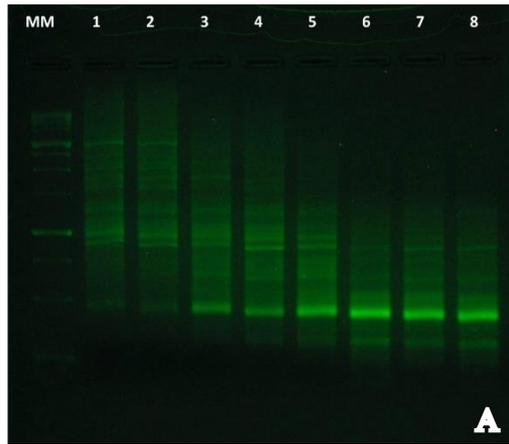
ISSR UBC	Sequência (5' → 3')	ISSR UBC	Sequência (5' → 3')
1	TCT CTC TCT CTC TCT CTC TCT	21	CTC TCT CTC TCT CTC TT
2	CAC CAC CAC CAC CAC CAC	22	ACA CAC ACA CAC ACA CYT
3	GAG GAG GAG GAG GAG GAG	23	ACA CAC ACA CAC ACA CYA
4	CTC CTC CTC CTC CTC CTC	24	ACA CAC ACA CAC ACA CYG
5	CAC ACA CAC ACA CAC ACA C	25	TGT GTG TGT GTG TGT GRT
6	GAG AGA GAG AGA GAG AGA G	26	TGT GTG TGT GTG TGT GRC
7	CTC TCT CTC TCT CTC TT	27	TGT GTG TGT GTG TGT GRA
8	CTC TCT CTC TCT CTC TA	28	GAA GGA AGG AAG GAA GAA
9	CTC TCT CTC TCT CTC TG	29	GAC AGA CAG ACA GAC A
10	CAC ACA CAC ACA CAC AA	30	TGT GTG TGT GTG TGT GTG T
11	GTG TGT GTG TGT GTG TT	810	GAG AGA GAG AGA GAG AT
12	TCT CTC TCT CTC TCT CG	828	TGTGTGTGTGTGTGTGA
13	ACA CAC ACA CAC ACA CC	835	AGA GAG AGA GAG AGA GYC
14	AGA GAG AGA GAG AGA GYT	836	AGAGAGAGAGAGAGAGYA
15	AGA GAG AGA GAG AGA GVA	844	CTCTCTCTCTCTCTRC
16	GAG AGA GAG AGA GAG AYT	849	GTGTGTGTGTGTGTGTYA
17	CTC TCT CTC TCT CTC TRA	864	ATGATGATGATGATGATG
18	CTC TCT CTC TCT CTC TRG	868	GAAGAAGAAGAAGAAGAA
19	CAC ACA CAC ACA CAC ARG		
20	CTC TCT CTC TCT CTC TRA		

Anexo 2. Tabela de todos os 38 primers testados do tipo SCoT.

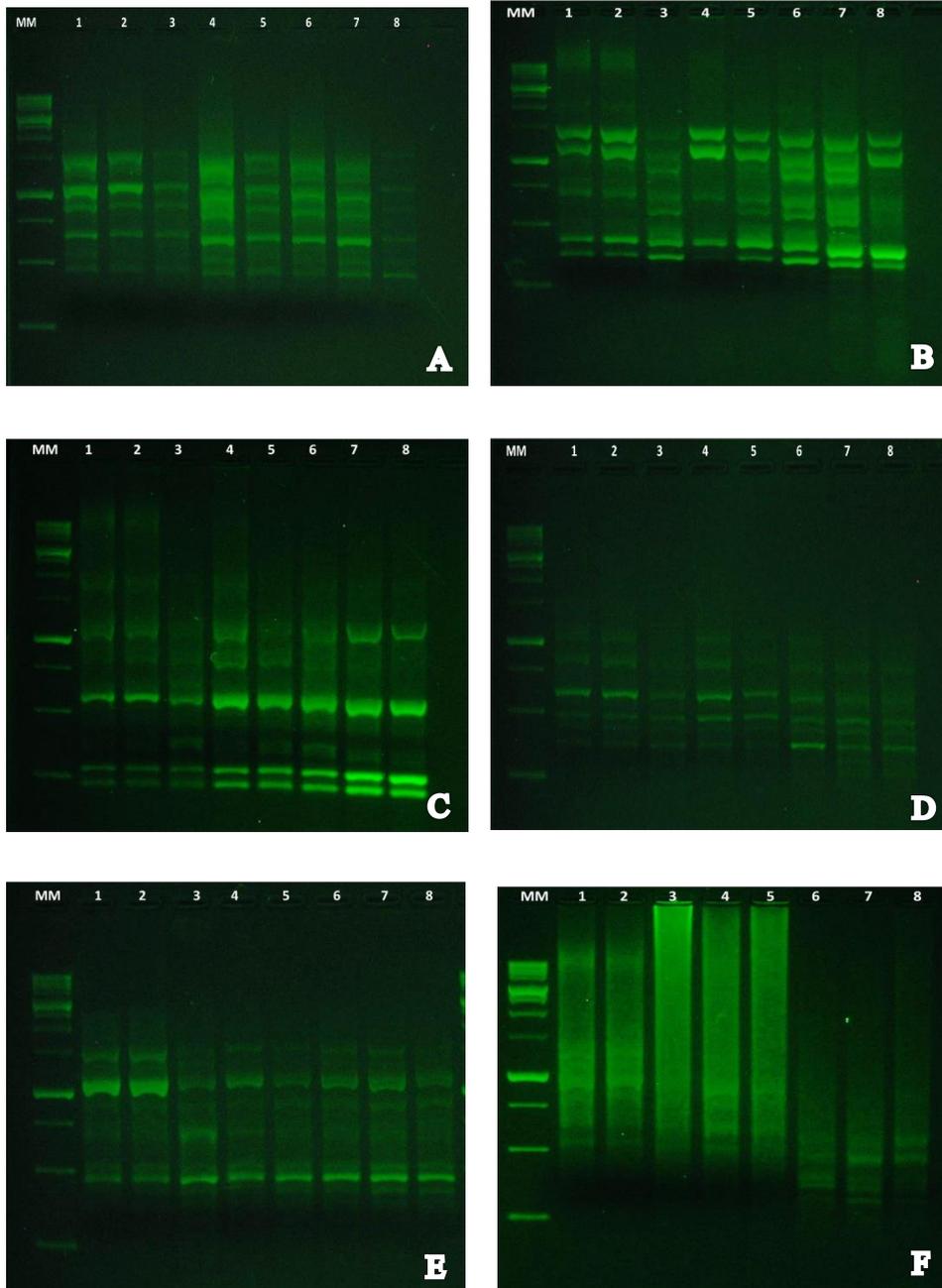
SCoT	Sequência	SCoT	Sequência
SCoT 1	CAACAATGGCTACCACCA	SCoT 21	ACGACATGGCGACCCACA
SCoT 2	CAACAATGGCTACCACCC	SCoT 22	AACCATGGCTACCACCAC
SCoT 3	CAACAATGGCTACCACCG	SCoT 23	CACCATGGCTACCACCAG
SCoT 4	CAACAATGGCTACCACCT	SCoT 24	CACCATGGCTACCACCAT
SCoT 5	CAACAATGGCTACCACGA	SCoT 25	ACCATGGCTACCACCGGG
SCoT 6	CAACAATGGCTACCACGC	SCoT 26	ACCATGGCTACCACCGTC
SCoT 7	CAACAATGGCTACCACGG	SCoT 27	ACCATGGCTACCACCGTG
SCoT 8	CAACAATGGCTACCACGT	SCoT 28	CCATGGCTACCACCGCCA
SCoT 9	CAACAATGGCTACCAGCA	SCoT 29	CCATGGCTACCACCGGCC
SCoT 10	CAACAATGGCTACCAGCC	SCoT 30	CCATGGCTACCACCGGCG
SCoT 11	AAGCAATGGCTACCACCA	SCoT 31	CCATGGCTACCACCGCCT
SCoT 12	ACGACATGGCGACCAACG	SCoT 32	CCATGGCTACCACCGCAC
SCoT 13	ACGACATGGCGACCATCG	SCoT 33	CCATGGCTACCACCGCAG
SCoT 14	ACGACATGGCGACCACGC	SCoT 34	ACCATGGCTACCACCGCA
SCoT 15	ACGACATGGCGACCGCGA	SCoT 35	CATGGCTACCACCGGCC
SCoT 16	ACCATGGCTACCACCGAC	SCoT 36	GCAACAATGGCTACCACC
SCoT 17	ACCATGGCTACCACCGAG	SCoT 37	ACGACATGGCGACCAGCG
SCoT 18	ACCATGGCTACCACCGCC	SCoT 39	AACCATGGCTACCACCGC
SCoT 19	ACCATGGCTACCACCGGC		
SCoT 20	ACCATGGCTACCACCGCG		



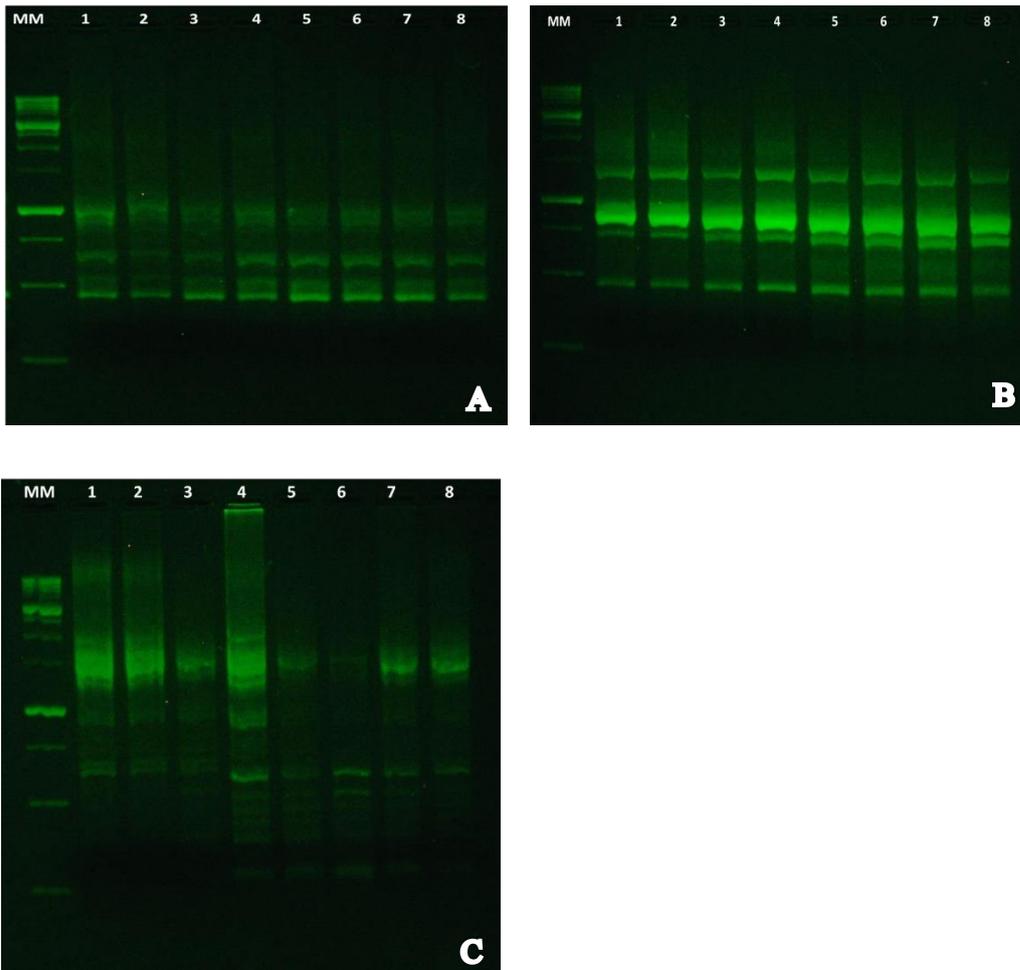
Anexo 3. Visualização em gel de agarose 1,5% dos produtos amplificados pelo marcador ISSR em cana-de-açúcar var. RB041443). A- ISSR UBC 9; B- ISSR UBC-10, C- ISSR UBC-12; D- ISSR UBC-13; E- ISSR UBC-19; F- ISSR UBC-22. MM MM. Marcador molecular 100 pb; **1.** Planta matriz; **2.** Casa-de-vegetação; **3.** Clone 1° subcultivo; **4.** Clone 2° subcultivo; **5.** Clone 3° subcultivo; **6.** Clone 4° subcultivo; **7.** Clone 5° subcultivo; **8.** Plântulas introduzidas em BIT.



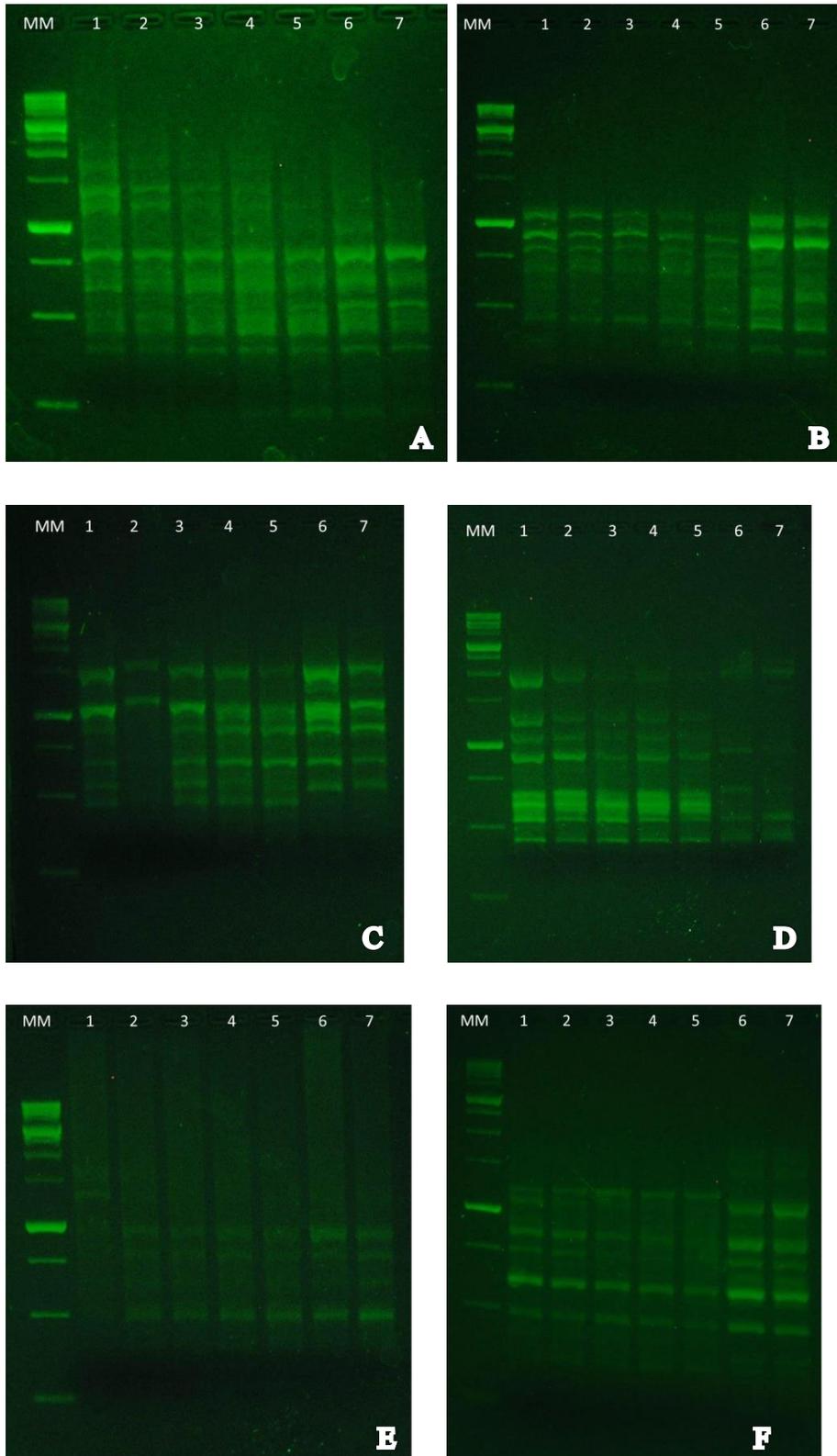
Anexo 4. Visualização em gel de agarose 1,5% dos produtos amplificados pelo marcador ISSR em cana-de-açúcar var. RB041443. A- ISSR UBC-23; B- ISSR UBC-24, C- ISSR UBC-27, D- ISSR UBC-29; E- ISSR-UBC 3. **MM.** Marcador molecular 100 pb; **1.** Planta matriz; **2.** Casa-de-vegetação; **3.** Clone 1^o subcultivo; **4.** Clone 2^o subcultivo; **5.** Clone 3^o subcultivo; **6.** Clone 4^o subcultivo; **7.** Clone 5^o subcultivo; **8.** Plântula introduzidas em BIT.



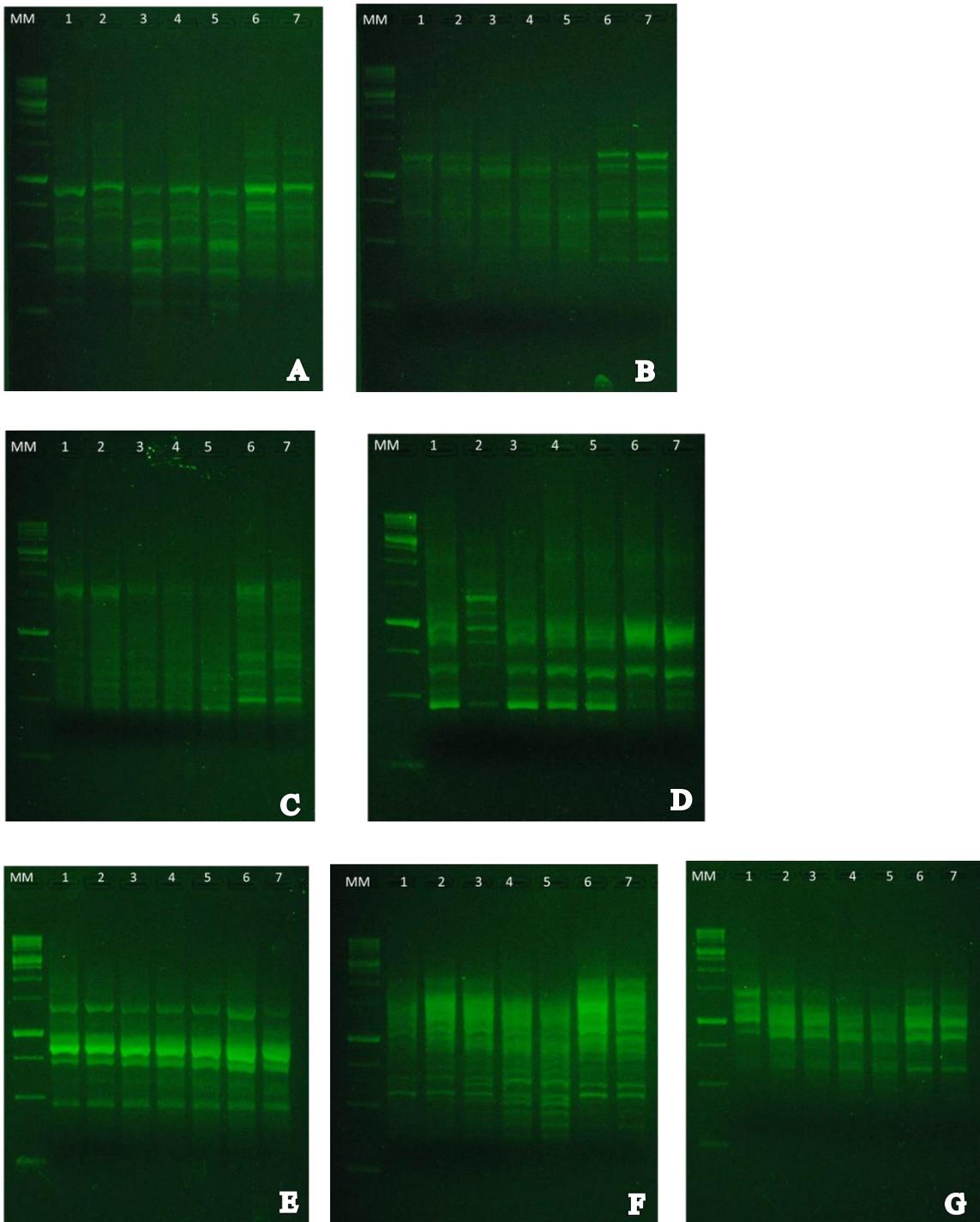
Anexo 5. Visualização em gel de agarose 1,5% dos produtos amplificados pelo marcador ISSR em cana-de-açúcar var. RB041443. A- ISSR UBC-813; B- ISSR UBC-834, C- ISSR UBC-835; D- ISSR UBC-836; E- ISSR UBC-844; F- ISSR UBC-849. **MM.** Marcador molecular 100 pb; **1.** Planta matriz; **2.** Casa-de-vegetação; **3.** Clone 1° subcultivo; **4.** Clone 2° subcultivo; **5.** Clone 3° subcultivo; **6.** Clone 4° subcultivo; **7.** Clone 5° subcultivo; **8.** Plântula introduzidas em BIT.



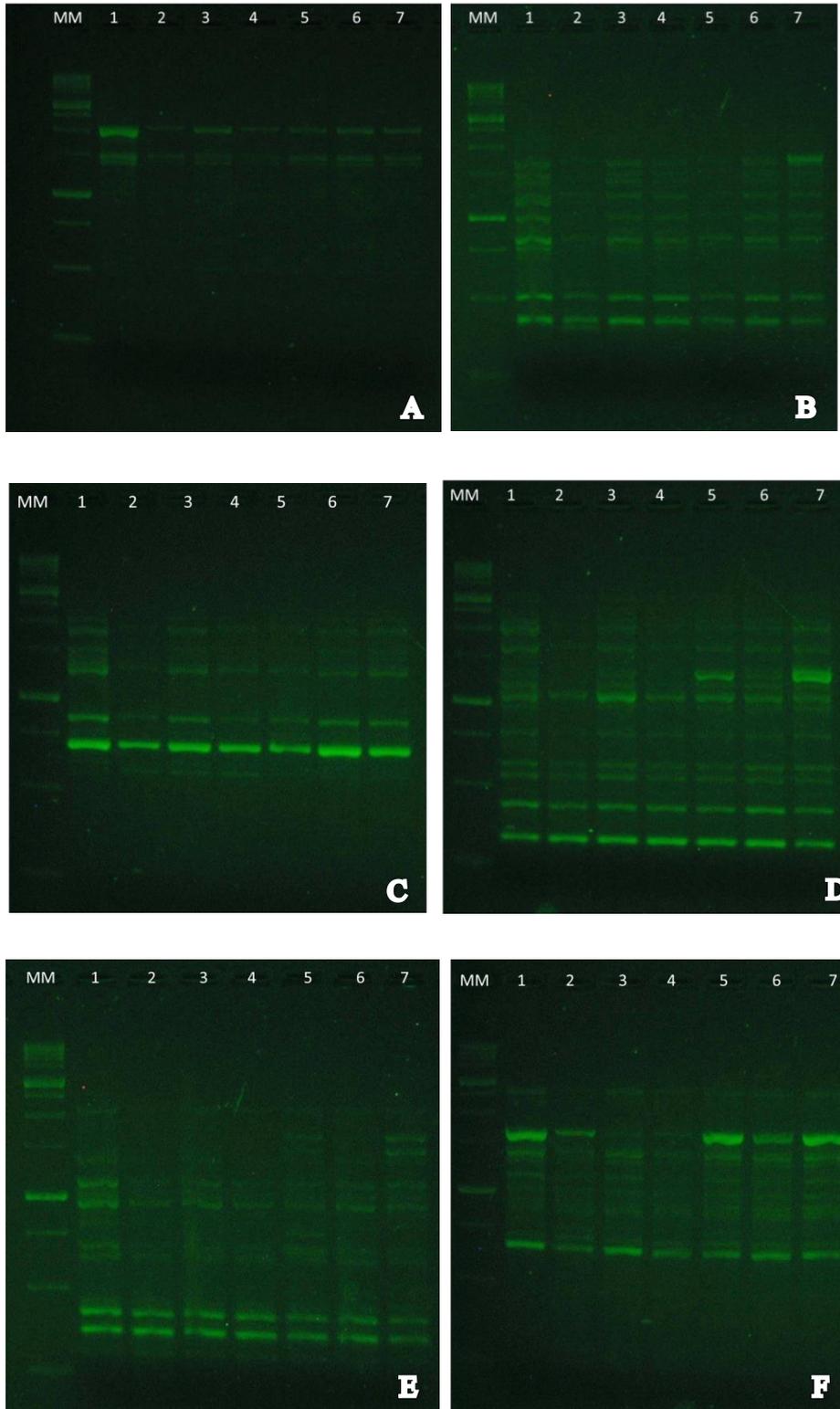
Anexo 6. Visualização em gel de agarose 1,5% dos produtos amplificados pelo marcador ISSR em cana-de-açúcar var. RB041443. A- ISSR UBC-864; B-ISSR UBC-866; C- .ISSR UBC-868. **MM.** Marcador molecular 100 pb; **1.** Planta matriz; **2.** Casa-de-vegetação; **3.** Clone 1° subcultivo; **4.** Clone 2° subcultivo; **5.** Clone 3° subcultivo; **6.** Clone 4° subcultivo; **7.** Clone 5° subcultivo; **8.** Plântula introduzidas em BIT.



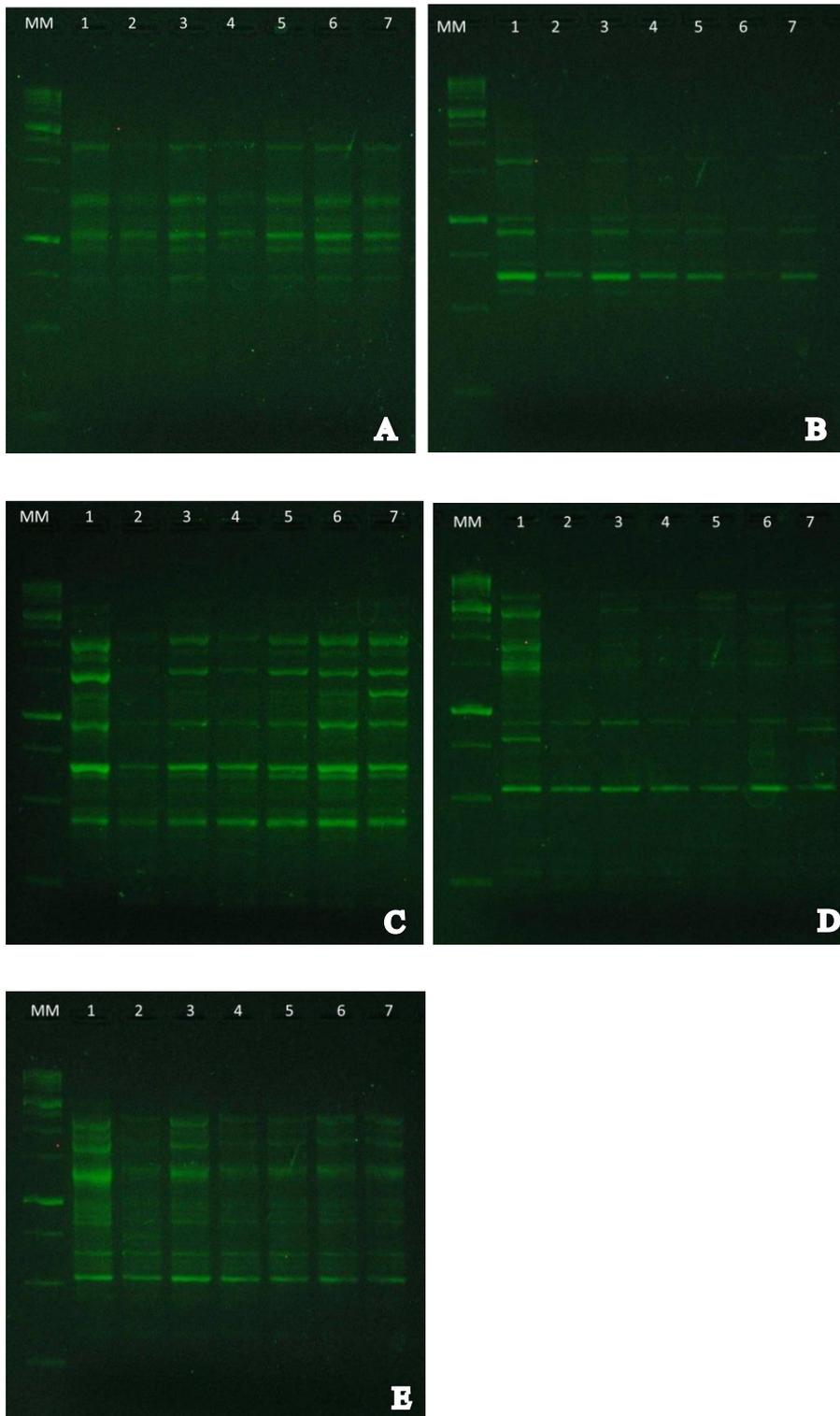
Anexo 7. Visualização em gel de agarose 1,5% dos produtos amplificados pelo marcador ISSR em cana-de-açúcar var. RB92579. A- ISSR UBC-3; B- ISSR UBC-810, C- ISSR UBC-813; D- ISSR UBC-815; E- ISSR UBC-817; F- ISSR UBC-836. **MM.** Marcador molecular 100 pb; **1.** Planta matriz; **2.** Clone 1° subcultivo; **3.** Clone 2° subcultivo; **4.** Clone 3° subcultivo; **5.** Clone 4° subcultivo; **6.** Clone 5° subcultivo; **7.** Plântula introduzidas em BIT.



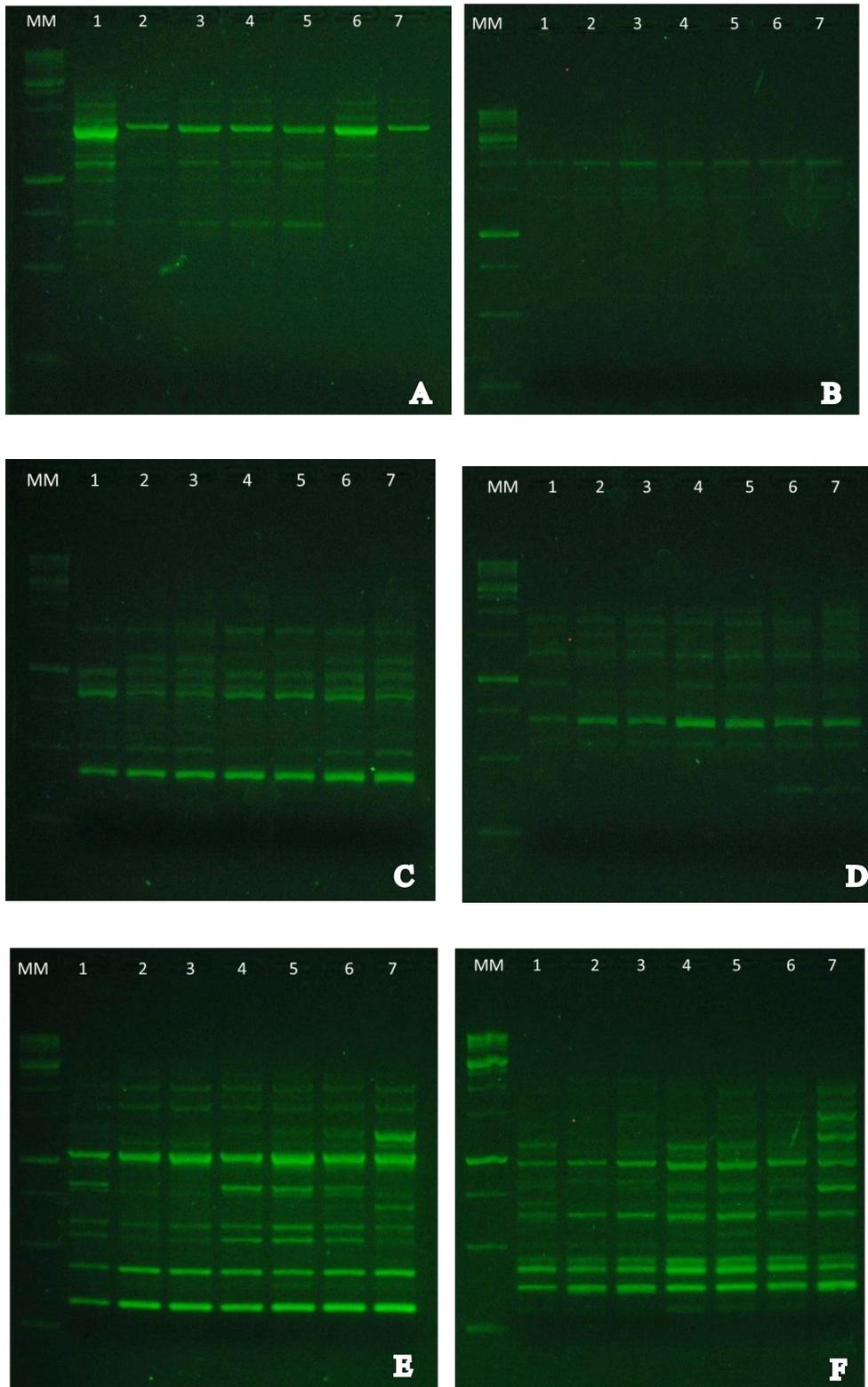
Anexo 8. Visualização em gel de agarose 1,5% dos produtos amplificados pelo marcador ISSR em cana-de-açúcar var. RB92579. A- ISSR UBC-848; B- ISSR UBC-855, C- ISSR UBC-859; D- ISSR UBC-864; E- ISSR UBC-866; F- ISSR UBC-868; G- ISSR UBC- 873. **MM.** Marcador molecular 100 pb; **1.** Planta matriz; **2.** Clone 1° subcultivo; **3.** Clone 2° subcultivo; **4.** Clone 3° subcultivo; **5.** Clone 4° subcultivo; **6.** Clone 5° subcultivo; **7.** Plântula introduzidas em BIT.



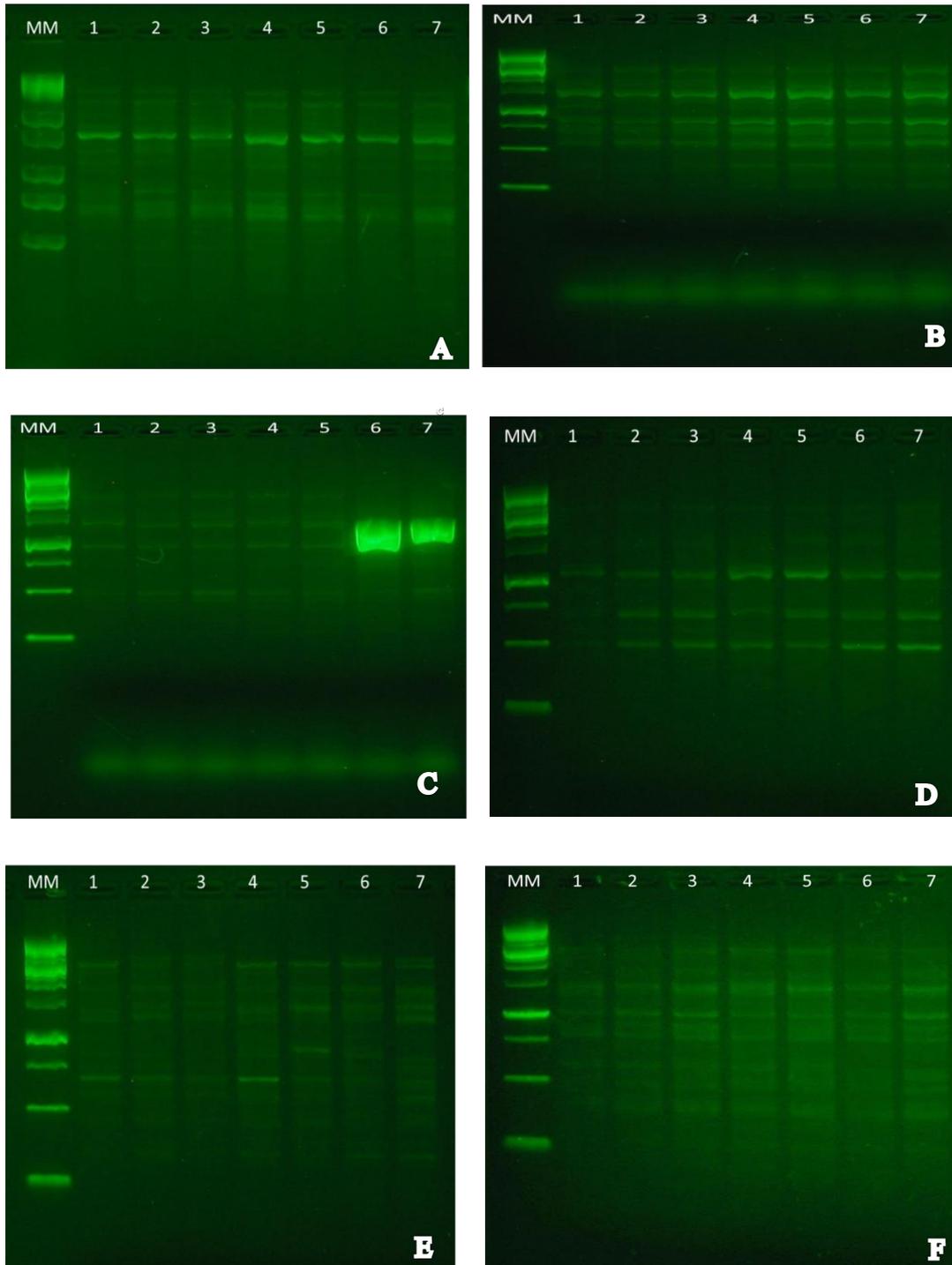
Anexo 9. Visualização em gel de agarose 1,5% dos produtos amplificados pelo marcador SCOT em cana-de-açúcar var. RB041443. A- SCoT-1; B- SCoT -12, C- SCoT -13; D- SCoT -14; E- SCoT -15; F- SCoT -21. **MM.** Marcador molecular 100 pb; **1.** Planta matriz; **2.** Clone 1° subcultivo; **3.** Clone 2° subcultivo; **4.** Clone 3° subcultivo; **5.** Clone 4° subcultivo; **6.** Clone 5° subcultivo; **7.** Plântula introduzidas em BIT.



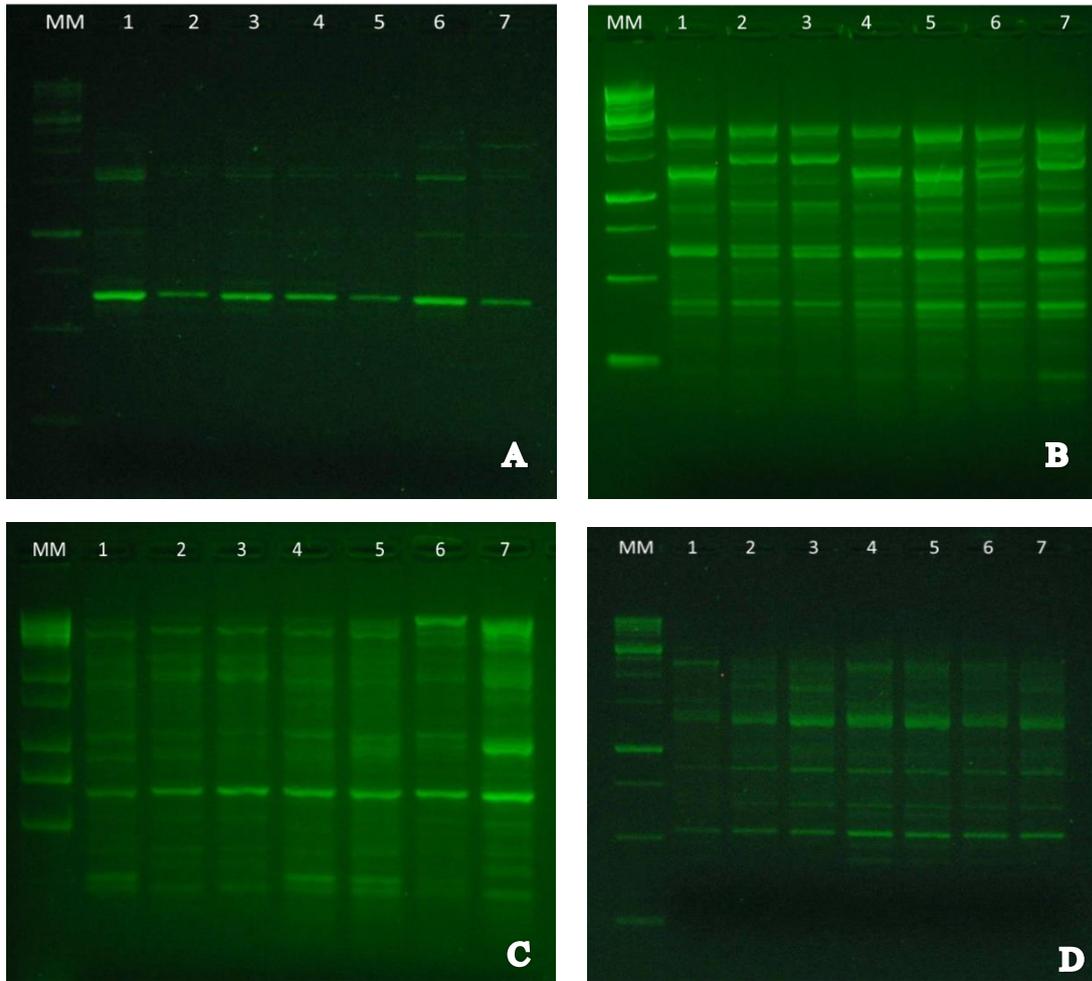
Anexo 10. Visualização em gel de agarose 1,5% dos produtos amplificados pelo marcador SCOT em cana-de-açúcar var. RB041443. A- SCoT-22; B- SCoT -34, C- SCoT -35; D- SCoT -37; E- SCoT -39. **MM.** Marcador molecular 100 pb; **1.** Planta matriz; **2.** Clone 1° subcultivo; **3.** Clone 2° subcultivo; **4.** Clone 3° subcultivo; **5.** Clone 4° subcultivo; **6.** Clone 5° subcultivo; **7.** Plântula introduzidas em BIT.



Anexo 11. Visualização em gel de agarose 1,5% dos produtos amplificados pelo marcador SCOT em cana-de-açúcar var. RB92579. A- SCoT-2; B- SCoT -11; C- SCoT -12; D- SCoT -13; E- SCoT -14; F- SCoT -15. **MM.** Marcador molecular 100 pb; **1.** Planta matriz; **2.** Clone 1° subcultivo; **3.** Clone 2° subcultivo; **4.** Clone 3° subcultivo; **5.** Clone 4° subcultivo; **6.** Clone 5° subcultivo; **7.** Plântula introduzidas em BIT.



Anexo 12. Visualização em gel de agarose 1,5% dos produtos amplificados pelo marcador SCOT em cana-de-açúcar var. RB92579. A- SCoT-18; B- SCoT -28, C- SCoT -29; D- SCoT -30; E- SCoT -31; F- SCoT -32. **MM.** Marcador molecular 100 pb; **1.** Planta matriz; **2.** Clone 1^o subcultivo; **3.** Clone 2^o subcultivo; **4.** Clone 3^o subcultivo; **5.** Clone 4^o subcultivo; **6.** Clone 5^o subcultivo; **7.** Plântula introduzidas em BIT.



Anexo 13. Visualização em gel de agarose 1,5% dos produtos amplificados pelo marcador SCOT em cana-de-açúcar var. RB92579. A- SCoT-34; B- SCoT -35, C- SCoT -37; D- SCoT -39. **MM.** Marcador molecular 100 pb; **1.** Planta matriz; **2.** Clone 1° subcultivo; **3.** Clone 2° subcultivo; **4.** Clone 3° subcultivo; **5.** Clone 4° subcultivo; **6.** Clone 5° subcultivo; **7.** Plântula introduzidas em BIT.