

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Centro de Desenvolvimento Tecnológico – CDTec
Curso de Graduação em Biotecnologia



Trabalho de Conclusão de Curso

Detecção de variação somaclonal utilizando marcadores
SSR e extração de RNA de cana-de-açúcar

Tatiane Casarin

Pelotas, 2014

Tatiane Casarin

Detecção de variação somaclonal utilizando marcadores SSR e extração de RNA de cana-de-açúcar

Trabalho acadêmico apresentado ao Curso de Bacharelado em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientadora acadêmica: Prof.^a. Dra. Luciana Bicca Dode

Orientador de Estágio: Prof. Dr. Sérgio Delmar dos Anjos
e Silva.

Pelotas, 2014

Dados de catalogação na fonte:
Ubirajara Buddin Cruz – CRB-10/901
Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

C335d Casarin, Tatiane

Detecção de variação somaclonal utilizando marcadores SSR e extração de RNA de cana-de-açúcar / Tatiane Casarin. – 44f. : il. – Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Biotecnologia). Universidade Federal de Pelotas. Centro de Desenvolvimento Tecnológico. Pelotas, 2014. – Orientadora Luciana Bicca Dode ; orientador de estágio Sérgio Delmar do Anjos e Silva.

Tatiane Casarin

**Detecção de variação somaclonal utilizando marcadores SSR e extração de
RNA de cana-de-açúcar**

**Trabalho de Conclusão de Curso aprovado, como requisito parcial, para
obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento
Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas.**

Data da Defesa: 10/01/2014.

Banca examinadora:

.....
Prof.^a Dra. Luciana Bicca Dode (Orientador)
Doutor em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

.....
Prof. Dr. Sérgio Delmar dos Anjos e Silva
Doutor em Fitotecnia pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

.....
Prof. Dr. Luciano Silva Pinto
Doutor em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

.....
Ma. Carla Ferreira Silveira
Mestre em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

“Dedico este trabalho de conclusão de curso a meus pais, cujo esforço, apoio e amor me permitiram chegar até aqui.”

Agradecimentos

Aos meus pais, Nelso e Marta, por todo o amor, todo o apoio desde o momento em que escolhi cursar Biotecnologia e todo o esforço que tiveram para me possibilitar a realização deste sonho.

Aos demais familiares, que mesmo de longe, sempre torceram por mim.

Às amigas, que apesar da distância, sempre torceram, confiaram e apoiaram, mesmo nos momentos de “crise”.

À professora Luciana, pela primeira oportunidade de estágio, pela orientação durante o estágio e TCC, e por todos os ensinamentos que vão além da sala de aula e do laboratório.

Ao professor Luciano, pelos ensinamentos e a oportunidade de bolsa de iniciação científica.

Aos demais professores da Biotecnologia, que contribuíram, cada um à sua forma, para a minha formação acadêmica.

Aos colegas de LAB 2, pela parceria e colaboração durante o período de estágio, especialmente Dani, Cíntia, Carla e Rafa, que tornaram muito mais divertidos os dias de trabalho e calor no fluxo.

Aos demais funcionários e colaboradores do Centro de Biotecnologia, que contribuíram direta ou indiretamente nesta jornada.

Ao pesquisador Sérgio, pela oportunidade de realizar meu estágio curricular obrigatório no Laboratório de Biologia Molecular, da Embrapa Clima Temperado.

Aos colegas da “Molecular”, sempre dispostos a ensinar e ajudar, e demais colegas de Embrapa com os quais convivi neste período de estágio.

Ao Paulo, por todo o amor, apoio, paciência e ajuda, tanto neste período de final de curso, como sempre.

Resumo

CASARIN, Tatiane. **Detecção de variação somaclonal utilizando marcadores SSR e extração de RNA de cana-de-açúcar.** 2013. 43f. Trabalho de Conclusão de Curso — Curso de Bacharelado em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas.

A cultura de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) tem papel importante na economia nacional, gerando importantes produtos dos setores de alimentos e também de energia renovável, bem como inúmeros postos de trabalho, diretos e indiretos. Portanto, tendo em vista aumentar as potencialidades da cultura, o estudo e emprego de técnicas moleculares que venham a auxiliar os programas de melhoramento têm recebido grande atenção e investimentos. Entre as técnicas de interesse estão a caracterização de genótipos através de marcadores moleculares e os estudos de transcriptômica para a identificação de genes associados a determinadas características de interesse agrônomo. Nesse sentido o presente trabalho teve como objetivo a utilização de marcadores moleculares SSR na identificação de variação somaclonal em plantas de cana-de-açúcar propagadas sucessivamente *in vitro* e também identificar o método de extração de RNA mais eficiente para folhas velhas, folhas novas e colmos de cana-de-açúcar, de modo a permitir estudos posteriores de expressão gênica. O DNA utilizado no SSR-PCR foi extraído pelo método de Ferreira & Grattapaglia, sendo testados 15 *primers* SSR. Após a amplificação, os produtos da reação foram separados em eletroforese em gel de agarose 3%, posteriormente, a análise dos géis foi realizada visualmente, sendo que a ocorrência ou não de variação somaclonal nas amostras estudadas foi determinada pela existência ou não de polimorfismo no padrão de bandas gerados para cada um dos *locus* estudados pelo marcador SSR. Para a avaliação de métodos de extração de RNA foram testados 5 métodos: M1: Concert™ Plant RNA Reagent; M2: TRIzol® Reagent (Invitrogen); M3: CTAB (Brometo de Hexadeciltrimetilamônio), adaptado. M4: RNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen); M5: PureLink® Plant Total DNA Purification Kit (Invitrogen). A pureza e a concentração RNA foram determinados em Nanovue Plus (GE Healthcare), as medidas de absorvância foram realizadas nos comprimentos de onda de 230, 260 e 280nm, sendo acompanhadas também as relações entre A260/A280 e A260/A230. Dentre os *primers* SSR utilizados, não foi constatada variação somaclonal para os pares UGSM312, SCM18, SCM21, SMOS156, UGSM296, SCM27 e SCM32. Os demais pares de *primers* se mostraram inconsistentes na identificação de variação somaclonal para as amostras utilizadas. Entre os métodos de extração analisados o M1, que utiliza o reagente comercial Concert™ Plant RNA Reagent, se mostrou o mais eficiente, pois apesar de não ter sido o método que mais extraiu, apresentou os melhores parâmetros de qualidade.

Palavras-chave: microssatélite, variação somaclonal, concert, trizol, CTAB.

Abstract

CASARIN, Tatiane. **Detection of somaclonal variation using SSR markers and RNA extraction from cane sugar**. 2013. 43f. Trabalho de Conclusão de Curso — Curso de Bacharelado em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas.

Sugar cane (*Saccharum* spp.) plays an important role in national economy, generating alimentary products and also renewable energy and direct and indirect job positions. With the aim of increase culture potential, the use and or study of molecular tools to help breeding programs have gained attention and founding. Belong important techniques, the genotype characterization by molecular markers and transcriptomic studies interest to identify genes relates to agronomical characters has the most importance. This study aimed identify somaclonal variation on sugar cane genetically modified and propagated in vitro by SSR and also adjust the RNA extraction method for young and old leafs, shoots in order to allow molecular studies. DNA used to SSR-PCR was obtained by Ferreira & Grattapaglia method, and 15 primers SSR were tested. After amplification, reaction products were separated by agarose 3% gel electrophoresis, and visually analyzed by comparing polymorphism, RNA extraction methods compared were M1: Concert™ Plant RNA Reagent; M2: TRIzol® Reagent (Invitrogen); M3: CTAB (Brometo de Hexadeciltrimetilamônio), adapted. M4: RNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen); M5: PureLink® Plant Total DNA Purification Kit (Invitrogen). DNA quality and concetration were determined by Nanovue Plus (GE Healthcare), comparison absobance at 230, 260 e 280nm, and A260/A280 and A260/A230. Were no observed somaclonal variation into UGSM312, SCM18, SCM21, SMOS156, UGSM296, SCM27 and SCM32 pairs. The others shown inconsistent results within these samples. The M1, method that uses Concert™ Plant RNA Reagent, was the most efficient, generating the best quality RNA.

Keywords: microsatellite, somaclonal variation, concert, triazol, CTAB.

Lista de Figuras

Figura 1: Imagem do perfil de bandas obtidas com o par de <i>primers</i> UGSM312, em gel de agarose 3%, para as 30 amostras de DNA analisadas, cada uma delas em duplicata, onde a letra M indica o marcador 1 kb plus.....	20
Figura 2: Imagem do perfil de bandas obtidas com o par de <i>primers</i> SCM18, em gel de agarose 3%, para as 30 amostras de DNA analisadas, cada uma delas em duplicata, onde a letra M indica o marcador 1kb plus.....	20
Figura 3: Imagem do perfil de bandas obtidas com o par de <i>primers</i> UGSM296, em gel de agarose 3%, para as 30 amostras de DNA analisadas, cada uma delas em duplicata, onde a letra M indica o marcador 1 kb plus.....	21
Figura 4: Concentração (ng/μl) de RNA extraído para os diferentes métodos testados.....	22
Figura 5: Relação A260/A280 nas amostras de RNA isolados de cinco métodos distintos a partir de folhas velhas (FV), folhas novas (FN) e colmo (C) de cana-de-açúcar.....	23
Figura 6: Relação A260/A230 nas amostras de RNA isolados de cinco métodos distintos a partir de folhas velhas (FV), folhas novas (FN) e colmo (C) de cana-de-açúcar.....	24

Lista de Tabelas

Tabela 1: <i>Primers</i> para marcadores SSR testados no presente estudo	15
Tabela 2: Métodos de extração de RNA testados neste estudo	16

Lista de Abreviaturas e Siglas

- µm – Micrômetro
- µL – Microlitro
- SSR – Marcador molecular microssatélite
- RNA – Ácido ribonucleico
- EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
- ATR – Açúcar total recuperável
- DNA – Ácido desoxirribonucleico
- RNase – Ribonuclease
- DNase – Desoxirribonuclease
- TBE – Tris/Borato/EDTA.
- CTAB – Brometo de cetiltrimetilamônio
- PVP – Polivinilpirrolidona
- EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético
- mM – Milimolar
- SSTE – tampão que contém (1 M NaCl, 0.5% SDS, 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0)
- SDS – Dodecil sulfato de sódio
- DEPC – Dicarbonato de dietila
- Kb – kilobases
- FN – Folha nova
- FV – Folha velha
- C – Colmo
- cDNA – DNA complementar

SUMÁRIO

Resumo.....	vi
Abstract.....	viii
Lista de Figuras.....	ix
Lista de Tabelas.....	x
Lista de Abreviaturas e Siglas.....	xi
1. Introdução.....	1
2. Objetivo.....	3
2.1. Objetivo Geral.....	3
2.2. Objetivos Específicos.....	3
3. Revisão Bibliográfica.....	4
3.1. A Cana-de-açúcar.....	4
3.1.1. Classificação botânica e generalidades.....	4
3.1.2. Morfologia.....	5
3.1.3. O cultivo da Cana-de-açúcar no mundo.....	6
3.1.4. A cultura da Cana-de-açúcar no Brasil e RS.....	7
3.2. Estresse Abiótico.....	8
3.3. Melhoramento da cana-de-açúcar.....	9
3.4. Marcadores moleculares no melhoramento genético de plantas.....	11
3.5. Identificação de marcadores moleculares.....	12
4. Materiais e métodos.....	14
4.1. Caracterização molecular de genótipos de cana-de-açúcar utilizando marcadores SSR para identificação de variação somaclonal.....	14
4.2. Avaliação de protocolo de extração de RNA para diferentes tecidos de cana-de-açúcar.....	16
5. Resultados e Discussão.....	19
5.1. Caracterização molecular de genótipos de cana-de-açúcar utilizando marcadores SSR para identificação de variação somaclonal.....	19
5.2. Avaliação de protocolos de extração de RNA para diferentes tecidos de cana-de-açúcar.....	21
6. Conclusões e Perspectivas.....	25

7. Referências Bibliográficas.....	26
---	-----------

1. Introdução

Este trabalho de conclusão de curso apresenta os dados experimentais obtidos durante estágio curricular obrigatório, realizado no Laboratório de Biologia Molecular da Empresa Brasileira de Agropecuária (Embrapa) de Clima Temperado, sob orientação do pesquisador Sérgio Delmar dos Anjos e Silva. Foram realizadas atividades relativas à cultura da cana-de-açúcar, englobando a caracterização molecular de uma população de plantas propagadas *in vitro* através de marcadores microssatélites (SSR) e a avaliação de diferentes métodos de extração de RNA para diferentes tipos de tecido de cana-de-açúcar, almejando o estabelecimento de protocolos eficientes para a aplicação rotineira de técnicas moleculares que permitam e auxiliem o melhoramento desta cultura de grande importância no Brasil e no mundo.

O setor sucroenergético vem ganhando destaque em investimentos e pesquisa, pois é o responsável por importantes produtos dos setores de alimentos e também de energia renovável. Dessa forma, vai ao encontro das necessidades humanas em um cenário de crescimento econômico e populacional mundial e também a necessidade de adoção de fontes renováveis de energia e incremento na produção de alimentos. No que diz respeito ao açúcar, alimento amplamente consumido no mundo todo, o seu mercado é tradicional e já está consolidado. Já em relação ao etanol, obtido a partir de matéria prima fermentada, o seu uso como combustível no mundo ainda é tímido, sendo o Brasil e os Estados Unidos seus principais produtores e consumidores (CONAB, 2013a).

No Brasil, o setor canavieiro possui um papel fundamental na geração de divisas, empregos e superávit na balança comercial. As exportações do complexo sucroalcooleiro ocupam o segundo lugar em valor exportado, superando outras importantes cadeias produtivas nacionais como a das carnes e do café, ficando atrás apenas do complexo soja. Apesar da importância do setor dentre as cadeias produtivas, nos últimos anos ele tem enfrentado dificuldades para crescer. Os reflexos da crise econômica de 2008 frearam bruscamente os investimentos em novas plantas industriais e na implantação de novos e melhoria dos canaviais existentes. Além disso,

condições climáticas desfavoráveis têm castigado os canaviais nas últimas safras, tornando cada vez mais urgente a necessidade do desenvolvimento de variedades tolerantes a estresses abióticos. Tais estratégias permitirão a expansão da cultura em regiões além das fronteiras agrícolas atualmente exploradas (CONAB, 2013a)

A cana-de-açúcar pertence ao gênero *Saccharum*, que é composto por seis espécies, todas caracterizadas pelo alto nível de ploidia, sendo consideradas bastante complexas. Os programas de melhoramento envolvendo a espécie visam à estimação da variabilidade genética, sendo de extrema importância não apenas para auxiliar a seleção, mas também em função dos riscos de degenerescência varietal que podem ocorrer nas variedades comerciais, afetando os rendimentos agrícolas e industriais. Assim, a retroalimentação de novas variedades que atendam as demandas agroindustriais deve ser continuamente mantida nos programas de melhoramento (ALMEIDA et al., 2009).

Nesse sentido, algumas ferramentas como a utilização de marcadores moleculares e estudos de transcriptômica podem ser extremamente úteis nos programas de melhoramento. A medida que os padrões de expressão de genes, passam a ser relacionados com a resposta a um determinado estresse, podem ser gerados, marcadores moleculares associados auxiliando na caracterização dos inúmeros materiais genéticos em seleção de programas de melhoramento de cana-de-açúcar.

2. Objetivo

2.1. Objetivo geral

Aplicar técnicas moleculares de interesse à cultura da cana-de-açúcar.

2.2. Objetivos específicos

Identificar a ocorrência ou não de variação somaclonal em uma população de plantas propagadas *in vitro* sucessivamente através da técnica de marcadores microssatélites.

Identificar o método mais adequado para a extração de RNA de folhas velhas, folhas novas e colmos de cana-de-açúcar, tendo em vista a obtenção de RNA puro e em quantidade suficiente para estudos posteriores de expressão gênica.

3. Revisão Bibliográfica

3.1. A Cana-de-açúcar

3.1.1. Classificação botânica e aspectos gerais da cultura

O gênero *Saccharum* foi descrito pela primeira vez por Lineu (1753) em seu livro *Species Plantarum*, onde descreveu duas espécies: *Saccharum officinarum* L. e *S. spicatum* L., que está atualmente classificado no gênero *Perotis* (DILLON et al. 2007).

No gênero, estão incluídos híbridos obtidos através de cruzamentos entre a espécie produtora de açúcar *Saccharum officinarum* ("cana nobre", oriunda do Sudeste Asiático) e das variedades selvagens *S. sinense* (clones chineses), *S. barberi* (clones do Norte da Índia) e *S. spontaneum*, além de uma série de retrocruzamentos com *Saccharum officinarum*, resultando em híbridos que apresentam altos níveis de poliploidia e aneuploidia, contendo em média de 100-120 cromossomos, tais cruzamentos deram origem às variedades comerciais atualmente em uso. A complexidade do genoma da cana-de-açúcar provavelmente excede a maioria das plantas cultivadas, o que vem dificultando o entendimento da sua genética e a aplicação de ferramentas biotecnológicas no melhoramento da cultura. Em função do uso de um número limitado de clones das diferentes espécies nos cruzamentos primários, a base genética dos híbridos modernos parece ser limitada, sendo algumas das dificuldades a serem superadas para o melhoramento da cultura (ROACH, 1972; ALBINO et al, 2006; D'HONT et al., 2008).

Botanicamente, a cana-de-açúcar é uma gramínea perene na sua forma natural, mas semianual no cultivo extensivo, pertencente à tribo *Andropogonae* da família *Poaceae*, ordem *Glumiflorae*, classe *Monocotyledoneae*, subdivisão *Angiospermae*, divisão *Embriófitassiphonogama*. A subtribo é *Sacharae* e o gênero *Saccharum*, derivado do sânscrito "sarkara =açúcar branco" (ENRIQUEZ-OBREGÓN et al. 1998).

A cana-de-açúcar é uma cultura que possibilita a obtenção de um elevado rendimento de matéria verde, energia e fibras, considerada uma das plantas com maior eficiência fotossintética. Tal capacidade permitiu à cultura se tornar uma das principais

fontes para a produção de açúcar e também de combustível renovável, o bioetanol (ENRIQUEZ-OBREGÓN et al. 1998).

3.1.2. Morfologia

O sistema radicular da cana é composto por raízes adventícias e permanentes. As raízes adventícias emergem da zona radicular do colmo e são responsáveis pela absorção de água durante a brotação das gemas, além de fornecer apoio e sustentação à planta até o desenvolvimento das raízes permanentes. As raízes permanentes são fasciculadas na base de brotos em crescimento, sendo divididas entre raízes de sustentação e raízes de absorção. A proporção entre um tipo e outro de raiz é espécie específico. *Saccharum officinarum* normalmente possui menor proporção de raízes de suporte em relação a *S. spontaneum*, o que poderia explicar o vigor e resistências a estresses ambientais superiores deste último (CHEAVEGATTI-GIANOTTO et al, 2011).

O caule, mais comumente conhecido como colmo, é um órgão de reserva de energia, formado pela alternância entre nós e entrenós. No nó, há uma folha de cicatriz, uma gema axilar, e uma faixa circunferencial de raiz primordial axilar. A morfologia do colmo é bastante variável entre os genótipos, podendo apresentar estrutura de diâmetro grosso ou fino, reto ou curvilíneo, mais alto ou mais baixo, podendo variar ainda quanto à cor e à presença de cerosidade e de folhas. Portanto a morfologia do caule pode ser um importante elemento de caracterização varietal (MARTIN, 1961; MAGRO et al., 2011).

As folhas da cana-de-açúcar são alternadas e ligadas ao caule, com uma folha por entrenó, são compostas por lâmina e bainha, separadas por uma junta de lâmina. A bainha cobre completamente o talo, estendendo-se por pelo menos um entrenó completo. Uma planta madura tem uma superfície foliar superior de em média 0,5 m² e cerca de dez folhas verdes por talo, dependendo da variedade e das condições de cultivo. A forma, tamanho e distribuição de tricomas, bem como a forma da lígula e das aurículas também são características taxonômicas importantes para a identificação varietal (MAGRO et al., 2011; MOORE, 1987).

A inflorescência é uma panícula de ramo aberto e ramificada formada por uma haste principal, chamada de engaço, que é a continuação do último entrenó do caule. Esta haste principal possui ramos secundários, que por sua vez possuem ramos terciários. As espiguetas são encontradas na base dos ramos terciários e na parte superior dos ramos secundários. Cada espiguetas apresenta uma flor, que está disposta

alternadamente ao longo dos ramos secundários e terciários da inflorescência. As flores são compostas por androceu e gineceu (CHEAVEGATTI-GIANOTTO et al, 2011).

Os grãos de pólen são esféricos quando férteis e prismáticos quando estéreis. O fruto, chamado cariopse, é seco, e indiescente, não podendo ser separados das sementes. O fruto só pode ser distinguido da semente através de microscopia eletrônica de varredura (CHEAVEGATTI-GIANOTTO et al, 2011).

No cultivo comercial, entretanto, a propagação da cana-de-açúcar é assexuada, sendo feita através do uso do colmo cortado em pedaços de aproximadamente trinta centímetros.

O crescimento do sistema radicular tem início logo após o plantio. As gemas, localizadas na base dos nós são meristemas embrionários laterais e se mantêm inativas durante a dominância apical, devido à ação das auxinas. Quando atingidas as condições favoráveis, a gema inicia o florescimento, o que normalmente ocorre cerca de 30 dias após a brotação. A planta jovem se nutre com a reserva do colmo plantado no solo e absorve água e nutrientes através das raízes primordiais, cada gema poderá dar origem a um colmo principal (MAGRO et al, 2011).

3.1.3. O cultivo da Cana-de-açúcar no mundo

A cana-de-açúcar é cultivada em mais de 20 milhões de hectares em regiões tropicais e subtropicais do mundo, produzindo até 1,3 bilhões de toneladas de colmos aptos à moagem. A cultura tem servido como uma importante fonte de açúcar há centenas de anos, representando uma fonte de biocombustível renovável de grande potencial, que poderia se transformar em uma *commodity* global e importante fonte de energia (PANDEY et al., 2000).

A área cultivada e a produtividade da cana-de-açúcar variam bastante, sendo cultivada atualmente em mais de 110 países. Em 2009, cerca de 1.683 milhões de toneladas foram produzidas em todo o mundo o que equivale a 22,4% da produção agrícola mundial total, em peso. Brasil e Índia são responsáveis por cerca de 50% de toda produção mundial. Enquanto o Brasil possui a maior área cultivada (5.343 milhões ha), a Austrália possui a maior produtividade, com cerca de 85 ton.ha¹ (FAO, 2009).

De acordo com as estimativas do *United States Department of Agriculture* (USDA), em seu relatório de maio de 2013, na safra 2013/14 serão produzidas cerca de 174,8 milhões de toneladas de açúcar, principal produto da cultura, volume praticamente idêntico ao produzido no ciclo atual. O Brasil é o maior produtor, com cerca de 33% da

produção mundial, seguido pela Índia (23%), China (7%), Tailândia (4%), Paquistão (4%), México (3%), Colômbia (3%), Austrália (2%), os Estados Unidos (2%) e as Filipinas (2%) (FNP 2009; CONAB, 2013a).

3.1.4. A cultura da Cana-de-açúcar no Brasil e RS

A importância da cultura da cana-de-açúcar tem raízes antigas na economia brasileira. As primeiras mudas da planta chegaram ao Brasil por volta de 1515, vindas da Ilha da Madeira (Portugal), tendo sido o primeiro engenho de açúcar construído em 1532, na capitania de São Vicente. Entretanto foi no Nordeste, especialmente nas capitanias de Pernambuco e da Bahia, que os engenhos de açúcar se multiplicaram. No século seguinte, o país já se tornava o maior produtor e fornecedor mundial de açúcar, posição mantida até o fim do século XVII. Historicamente, a cana-de-açúcar sempre foi um dos principais produtos agrícolas do Brasil e, hoje, o País tem novamente a primeira posição no ranking mundial da cultura (CIB, 2009).

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, seguido por Índia, Tailândia e Austrália. As regiões de cultivo são Sudeste, Centro-Oeste, Sul e Nordeste, permitindo duas safras por ano. O 2º Levantamento da Safra 2013/14, realizado pela Conab, em agosto de 2013, apontam para uma produção de cerca de 652 milhões de toneladas de cana-de-açúcar, registrando aumento de 10,7% em relação à safra anterior. Deste total, 47,8% serão destinados para a produção de açúcar, enquanto que o restante (52,2%) será para a produção de etanol (CONAB, 2013a).

Para a safra 2013/2014 a área de cultivo continua em expansão, com previsão de acréscimo de cerca de 314 mil hectares, equivalendo a 3,7% em relação à safra 2012/13. Tal acréscimo se deve ao aumento de área da Região Centro-Sul, já que a região Norte/Nordeste se manterá com praticamente a mesma área para a próxima safra. Assim, a área total prevista é de 8.799.150 mil hectares, distribuídas em todos estados produtores conforme suas características. O maior produtor continua sendo o estado de São Paulo, com área correspondente a cerca de 51% do total nacional, seguido por Goiás com 9,3%, Minas Gerais com 8,0%, Paraná com 7,04%, Mato Grosso do Sul com 7,09%, Alagoas com 5,02% e Pernambuco com 3,25%. Para os demais estados produtores, as áreas são menores, com representações inferiores 3,0% (CONAB, 2013b).

O Brasil é o maior exportador mundial de açúcar, respondendo sozinho por 45% de todo o produto comercializado. Já em relação ao etanol, o país divide com os EUA o

papel de maior produtor mundial – juntos, os dois países são responsáveis por 70% de todo o etanol produzido no planeta. Ainda assim, o Brasil é também o maior exportador mundial de etanol, respondendo por 54% desse mercado, já que o produto norte-americano é exclusivamente derivado de milho e focado em suprir a demanda interna do país (CIB, 2009).

No Rio Grande do Sul, o percentual de açúcar total recuperável (ATR) destinado à produção de apenas etanol hidratado. A área cultivada na safra 2012 foi de 33.105 hectares, com uma produção de cerca de 980 mil toneladas. Estes números bastante distantes dos principais produtores podem ser justificados pelas condições climáticas do estado, que não são as ideais para as cultivares atualmente utilizadas (CONAB, 2013b; IBGE, 2013).

3.2. Estresse Abiótico

Em ambientes naturais e agricultáveis, as plantas são expostas a condições desfavoráveis: seca, a salinidade, o resfriamento, o congelamento, a elevadas temperaturas, alagamento ou intensa luminosidade, são alguns exemplos frequentes. Estas condições são coletivamente chamadas de estresses abióticos e qualquer uma delas pode retardar o crescimento e o desenvolvimento, reduzir a produtividade e, em casos extremos, levar a planta à morte. Dessa forma, o estresse abiótico é a principal causa de perda de culturas em todo o mundo, reduzindo o rendimento médio para a maioria das principais plantas cultivadas em mais de 50% (QUIANG et al., 2000; XIONG et al., 2002).

A cultura da cana-de-açúcar é bastante suscetível ao estresse abiótico, onde variações climáticas durante a safra, seja relação às chuvas, às temperaturas ou à luminosidade fora dos níveis esperados, têm consequências imediatas no resultado final da safra, tanto na produtividade da cultura, como causando redução na capacidade de acúmulo de sacarose pelo colmo, e conseqüentemente poderá haver um comprometimento no rendimento de produtos. Além disso, os danos causados às plantas maduras podem prejudicar seriamente a rebrota de plantas jovens e soqueiras (CONAB, 2013b; MOORE, 1987).

Para o Rio Grande do Sul, o principal fator limitante para a expansão da cultura é o estresse por frio, que afeta o desenvolvimento das plantas e causa graves perdas tanto nesta quanto na maioria das culturas de importância econômica, seja em condições de frio ou de congelamento. O acúmulo de gelo pode resultar na ruptura de células e tecidos,

afetando a estrutura e função da parede celular e causando desidratação. Tais condições têm efeito ainda sobre os níveis de fitormônios, prolongam o ciclo celular e ativam vias de sinalização de resposta ao frio (XIN & BROWSE, 2000).

Dessa forma, torna-se importante a busca por novas variedades mais resistentes a diferentes condições edafoclimáticas, permitindo assim a expansão da cultura visando atender à crescente demanda por alimentos e energia renovável. A identificação de genótipos mais tolerantes e de genes associados a respostas ao frio estão entre as principais estratégias que auxiliarão o melhoramento da cultura neste sentido.

3.3. Melhoramento da cana-de-açúcar

Tendo em vista a importância econômica e social da cultura, o aprimoramento das práticas de cultivo foi um processo natural, cujas bases são históricas. No decorrer de muitas décadas, especialistas e pesquisadores foram adequando características morfofisiológicas da planta, apesar de sua complexa composição genética. Entre os principais objetivos dos programas de melhoramento, estão incremento no rendimento da cultura, na capacidade de corte dos caules, na resistência a doenças, o aumento do conteúdo de açúcares e a manutenção dos níveis de fibras aceitáveis para a moagem. O processo de melhoramento tradicional de cana é baseado na seleção e clonagem de genótipos superiores de populações segregantes obtidas pelo cruzamento de indivíduos contrastantes. Para maximizar a eficiência deste processo, que é bastante longo, ele é dividido em várias fases, que incluem a escolha de parentais adequados e quantificação dos efeitos ambientais sobre a expressão dos caracteres de seleção (CIB 2009; JACKSON, 2005).

Um programa de melhoramento de cana deve iniciar pelo estabelecimento de um conjunto de germoplasmas em uma região onde seja possível a floração intensa das plantas e o tempo de floração das linhas parentais possam ser sincronizados. No Brasil, a região que apresenta as condições mais favoráveis para a floração é a Nordeste, por isso, a maioria dos programas de melhoramento atualmente ativos se localizam na região, entretanto já existem programas de melhoramento em andamento na região sul do país, que visam a adaptação da cultura. Após o estabelecimento do banco de germoplasma, deve ser planejado e executado um grande número de cruzamentos entre genótipos parentais selecionados. As sementes resultantes irão dar origem a um grande número de descendentes (mudas), com combinações genéticas a serem selecionadas em busca de indivíduos superiores. O processo de seleção é realizado em locais distintos

para identificar esses genótipos superiores, com melhor desempenho agrônomo e tolerância a estresses bióticos e abióticos, considerando-se sempre as condições edafoclimáticas e de infestação de pragas e doenças de cada região na qual se tem interesse de cultivo. Em média, uma variedade comercial pode ser obtida para cada 250.000 mudas avaliadas na primeira etapa do programa de melhoramento (T1). O processo de seleção continua na segunda e terceira fases, avaliadas em diferentes condições ambientais. Os clones elite que oferecerem maior produtividade que as cultivares já utilizadas comercialmente são recomendados e liberados (CHEAVEGATTI-GIANOTTO et al., 2011; JACKSON, 2005).

Apesar das dificuldades impostas pelo complexo genoma da cultura, métodos de transformação genética têm sido relatados há algumas décadas, como uma tentativa de introduzir as características de interesse para a cultura de forma mais rápida em relação ao melhoramento tradicional. Entre as primeiras experiências em cana-de-açúcar, Chen et al., em 1987, introduziram um gene de resistência à canamicina através de eletroporação de protoplastos e tratamento com polietilenoglicol. Posteriormente foram descritas metodologias de transformação genética tanto por biobalística quanto via *A. tumefaciens*, para a inserção de diferentes genes, através das quais foi possível obter variedades resistentes a herbicidas, resistentes a pragas e doenças, tolerantes a estresse hídrico e com maior acúmulo de sacarose. A biobalística é um sistema bastante eficiente para inserção de genes em variedades de cana-de-açúcar, sendo amplamente estudada e podendo gerar uma maior competitividade no mercado. Entretanto, problemas quanto à complexidade de integração do transgene têm sido comumente relatados, visto que um grande número de cópias do gene pode ser inserido em regiões onde não ocorre transcrição ativa. Na tentativa de superar estas dificuldades, a aplicação da transformação da cana-de-açúcar mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, técnica que promove a inserção de poucas cópias em sítios altamente expressos do genoma, passou a ser estudada por muitos pesquisadores. A cultura tem sido estudada quanto ao seu potencial como biofábrica, na obtenção de produtos de alto valor agregado, como bioplásticos e isômeros de sacarose com alto valor comercial (CHEAVEGATTI-GIANOTTO et al., 2011; ULIAN, 2007; SILVA et al., 2011).

No Brasil, os programas de melhoramento da cana-de-açúcar ativos atualmente são: CanaVialis em Maceió (AL), Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroalcooleiro - RIDESA em Murici (AL), Centro de Tecnologia Canavieira - CTC em Camamu (BA), do Instituto Agrônomo de Campinas - IAC em Uruca (BA) e o

Siscana (RS). Este último recentemente estabelecido numa parceria entre Petrobras e Embrapa Clima Temperado, e pretende desenvolver tecnologias para o cultivo de cana-de-açúcar como base para produção de etanol no estado do Rio Grande do Sul, através do genótipos superiores com características agrônômicas e industriais, adequadas para produção nas condições do RS (CIB, 2009; EMBRAPA, 2013).

3.4. Marcadores moleculares no melhoramento genético de plantas

Ao longo dos anos, nos programas de melhoramento genético, ao se selecionar variedades mais produtivas, de melhor qualidade industrial, mais tolerantes a estresses e com melhor adaptação ecológica, foi possível obter um importante incremento nos rendimentos agrícolas e até mesmo reduzir o uso de insumos pelo produtor, contribuindo para a preservação do meio ambiente e da saúde humana. Entretanto, muitas destas características, principalmente as de herança quantitativa, são difíceis de selecionar através de caracteres fenotípicos, tanto na escolha dos parentais quanto na seleção em populações segregantes. Nesse sentido, a biologia molecular tem disponibilizado ferramentas que podem ajudar na superação destas dificuldades (BRAMMER, 2000).

Dessa forma, o uso de marcadores moleculares pode ser uma valiosa ferramenta na busca por um melhor entendimento de um genoma complexo como o da cana-de-açúcar. A sua incorporação na seleção das características de interesse agrônômico nos primeiros estágios dos programas de melhoramento pode ajudar a reduzir consideravelmente o tempo despendido no desenvolvimento de novas variedades. Para tanto, faz-se necessário a identificação de marcadores polimórficos robustos que co-segregam com estas características.

Além de ajudarem os melhoristas a refinarem as estratégias gerais para explorar os germoplasmas existentes, os marcadores moleculares permitem ainda realizar a identificação de cultivares, controlar a progênie, monitorar introgressão, verificar a ocorrência de variação somaclonal após sucessivo cultivo *in vitro*, permitindo análises de filogenia entre as espécies do gênero, espécies relacionadas, e seus híbridos e clones. Dentre os marcadores já utilizados na cultura da cana-de-açúcar estão o polimorfismo para comprimento de fragmentos de restrição (RFPL), polimorfismo de fragmentos de DNA amplificados ao acaso (RAPD), microssatélites ou SSR (Simple Sequence Repeats), *Target Region Amplification Polymorphism* (TRAP), e inter-AluPCR (ALBINO et al, 2006).

Dentre estes, os microssatélites estão entre os marcadores moleculares mais amplamente utilizados, tanto em plantas quanto em animais, para estudos de mapeamento genômico, *fingerprinting*, estudos evolucionários e populacionais. Os microssatélites podem ser definidos como sequências de um a seis nucleotídeos repetidos de 10 a 60 vezes em tandem ao longo da molécula de DNA, amplamente distribuídas nos genomas eucariotos, sendo flanqueadas por regiões conservadas, que produzem polimorfismos baseados na diferença entre o número de unidades repetidas de DNA em um determinado locus (CORDEIRO et al., 2001).

Devido a habilidade dos microssatélites de detectar alta diversidade alélica, este marcador se destaca como particularmente útil na distinção entre genótipos. As altas taxas de mutação observadas, na ordem de $4.10^4 - 5.10^6$ mutações por alelo por geração, fazem destes marcadores frequentemente multialélicos, além de segregarem de modo co-dominante. Além disso, são mais variáveis do que RFLPs ou RAPDs, mais confiável e reprodutível, oferecendo um maior poder de discriminação para revelar associações entre linhagens. Portanto, e também pelo sucesso do uso deste marcador em diversas culturas, como cevada, arroz, trigo, maçã e abacate, foi considerado como uma possibilidade também para a cana-de-açúcar (CORDEIRO et al., 2001; BRAMMER, 2000; XU, 2010).

Como vantagens desta técnica ainda é possível citar que podem ser prontamente analisados por PCR e facilmente detectáveis em géis de agarose ou poliacrilamida, dependendo da diferença de tamanho entre os produtos amplificados, as análises podem ser automatizadas e necessitam de pequenas concentrações iniciais de DNA (menos de 100 ng por amostra). Dessa forma, os microssatélites são os marcadores mais adequados quando se tem em vista a caracterização e identificação de germoplasma para pesquisa, conservação, determinação e monitoramentoda diversidade genética na agricultura, bem como para o apoio da propriedade intelectual (XU, 2010).

3.5. Identificação de marcadores moleculares

A partir dos diversos projetos Genoma, financiados por várias instituições no Brasil e no mundo, foi possível ampliar o conhecimento da estrutura do genoma dos organismos, além de possibilitar a formação de pessoal especializado em técnicas de clonagem e sequenciamento. Apesar disso, o conhecimento de todas as sequências de bases que compõe um genoma não permite identificar a função e os mecanismos de controle da expressão de todos os genes presentes no organismo. Recentemente, com

o advento de técnicas cada vez mais aprimoradas e o aumento da disponibilidade de sequências de dados, o padrão de expressão de genes tem sido usado para identificar aqueles que estariam envolvidos na resposta adaptativa aos diferentes tipos de estresse abiótico (STOLF, 2007).

Estas informações possibilitariam identificar genes induzidos por estresse, que possam estar associados a um efeito de tolerância ou de resposta de defesa a essas condições, permitindo a associação desses genes candidatos a marcadores moleculares, que por sua vez, ampliam a aplicabilidade da seleção assistida por marcadores moleculares, bem como da engenharia genética, e/ou outras pesquisas genômicas (STOLF, 2007).

Entre as principais técnicas que possibilitaram avanços consideráveis na compreensão dos mecanismos envolvidos na expressão e regulação de genes candidatos e o desenvolvimento de estratégias moleculares para o aumento da tolerância a estresses estão os microarranjos de DNA e os sequenciamentos de larga escala (RNA-Seq), que permitem a análise de expressão gênica em larga escala, e PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR), que compreende uma adaptação da reação em cadeia da polimerase que permite, entre outras abordagens, a quantificação comparativa dos níveis dos RNA mensageiros sob diferentes condições (KASUGA et al., 2004; HELLER, 2002).

Para este último é indispensável a obtenção de quantidades significativas de RNA, o qual deve apresentar-se puro, uma vez que a utilização de RNA de baixa qualidade pode comprometer a confiabilidade dos resultados destes estudos, causando desperdício de tempo e investimentos financeiros. Um RNA de qualidade deve ser intacto e livre de contaminação com RNases, proteínas, DNA genômico, e qualquer outra substância que possa comprometer a realização da técnica (BUSTIN et al., 2004; FLEIGE et al., 2006).

4. Materiais e métodos

4.1. Caracterização molecular de genótipos de cana-de-açúcar utilizando marcadores SSR

As análises foram realizadas no Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Clima Temperado, Pelotas/RS. O material vegetal utilizado foi obtido de 3 genótipos de cana-de-açúcar propagada sucessivamente em cultivo *in vitro*, proveniente da Universidade Federal do Paraná. Para avaliação da variabilidade genética utilizando marcadores microsátélites (SSR), e identificação de variações entre os clones, o DNA de folhas foi extraído pelo método de Ferreira & Grattapaglia. A qualidade do DNA extraído foi avaliada em gel de agarose 1% corado com Gel Red (Biotium). A quantificação do DNA foi realizada utilizando fluorômetro Qubit (Life Technologies).

Foram testados 15 *primers* SSR (Tabela 1), dentre os 31 *primers* sintetizados a partir do genoma da cana-de-açúcar, conforme artigo apresentado por SINGH et al. (2010).

Tabela 1. *Primers* para marcadores SSR testados no presente estudo.

<i>Primer</i>	<i>Primer Forward</i>	<i>Primer Reverse</i>
SCM4	F: CAT TGT TCT GTG CCT GCT	R: CCG TTT CCC TTC CTT CCC
SCM18	F: CAT CAG TAT CAT TTC ATC TTG G	R: CAG TCA ACG TCG GGT AGA
SCM21	F: CCC TCC CAT AAC ACA CAC	R: TTG ACA GCC CAA AGA GTT
SCM27	F: TTC TCT GAC TTC CAA TCC AA	R: ATC AAG CAC GCC CGC CTC
SCM32	F: GAT GAA GCC GAC ACC GAC	R: AGT TGC CTG TTC CCA TTT
SOMS58	F: CCG CTT TCA ACC TCT ACA C	R: GGC TTG GTG ATT CTT CTC T
SOMS124	F: TAG AGG AAA TAG CAG AAC AGG	R: AGA CTG ACA CCT TTG AGA TGA
SOMS148	F: GAT GAC TCC TTG TGG TGG	R: CTT GAC GAC CCT GCT GCT
SOMS156	F: ATC GTC TCT GGT TGT TGG T	R: ATC CTC CAT TTC CAC CTC
UGSM296	F: ATT ATC TAC ATT CAG ACA CGT CAC	R: ATC TTT GTT AGC AAT CCA TTA AG
UGSM312	F: AAC GTA TCT TTA TTT CCA TTC TTC	R: CTT TCA GTT CAA CTT TGG ATA AAT
UGSM542	F: ACC TCC ACC TCC ACC TCA TGG C	R: CGT TCA GTC TCA GGG TGT CGA T
UGSM575	F: CTG TTT CCT TCC TTC TCG T	R: CAA TCA TAG CCC AGA CAC C
UGSM585	F: GAA GAG GAGGAG AGG AGA AG	R: TGG GAT GGT TGT TGA CTG
UGSM671	F: TCC CTA CTT CTA TGA ATA TCC TTC	R: TTG ACA AAT TGC TTG ATG TAG T

O SSR-PCR foi desenvolvido numa reação com GoTaq Green Master Mix (Promega) a partir do protocolo desenvolvido pelo fabricante, sendo que o volume final de cada reação foi de 12,5 μ l, contendo 6,25 μ l de GoTaq Master Green Mix, 50 ng de DNA e 1,2 μ M de cada *primer* (*Forward* e *Reverse*).

As reações foram amplificadas em termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems). O programa de amplificação utilizado foi constituído de 30 ciclos a 94 °C por 1 minuto, 52°C ou 60°C por 1 minuto (dependendo da especificidade desejada em cada reação), 72 °C também por 1 minuto e extensão final a 72 °C por 5 minutos. Cada uma das 30 amostras foi amplificada em duplicata.

Os produtos da reação foram separados através de eletroforese em gel de agarose 3% em Tampão TBE 1X, corados com Gel Red (Biotium) e fotografados sob luz UV, em um fotodocumentador digital Gel Logic 2200 Molecular Imaging System (Carestream Health, INC). Após a separação dos fragmentos amplificados, a análise dos géis foi realizada visualmente, sendo que a ocorrência ou não de variação somaclonal

nas amostras estudadas foi determinada pela existência ou não de polimorfismo no padrão de bandas gerados para cada um dos *locus* estudados pelo marcador SSR.

4.2. Avaliação de protocolos de extração de RNA para diferentes tecidos de cana-de-açúcar

Material vegetal

O experimento foi conduzido no Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Clima Temperado, Pelotas/RS. Foram utilizados três diferentes tecidos amostrados de plantas de cana-de-açúcar, folhas velhas (folhas totalmente formadas, maduras), folhas novas (folhas que estão se desenrolando do colmo) e colmo, de diferentes genótipos pertencentes à coleção de trabalho da Embrapa Clima Temperado. Os tecidos vegetais foram previamente macerados com o auxílio de nitrogênio líquido, aliqüotados em tubos de 1,5 mL, contendo 100 mg de tecido macerado cada e armazenados em ultra-freezer a -80 °C até o momento da extração de RNA.

Métodos de extração de RNA

Foram avaliados cinco métodos de extração de RNA, descritos na Tabela 2.

Tabela 2: Métodos de extração de RNA testados neste estudo.

Identificação	Método	Descrição
M1	Concert™ Plant RNA Reagent (Invitrogen)	Regente comercial
M2	TRIzol® Reagent (Invitrogen)	Reagente comercial
M3	CTAB (Brometo de Hexadeciltrimetilamônio), adaptado	Extrator preparado em laboratório
M4	RNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen)	Kit comercial
M5	PureLink® Plant Total DNA Purification Kit (Invitrogen)	Kit comercial

Para a execução do M3, as alíquotas previamente preparadas foram ressuspensas em 1,25 mL de tampão de extração aquecido a 65 °C [2% (p/v) CTAB (cethyltrimethylammonium bromide), 2% (p/v) PVP, 100 mM de Tris-HCL, 25 mM de EDTA, 20 mM de NaCl], que auxiliará na solubilização dos lipídeos da membrana plasmática, acrescido de 42 µL de β-mercaptoetanol.

As amostras foram homogeneizadas vigorosamente com auxílio de vórtex e incubadas também à 65 °C por 5 minutos, sendo novamente homogeneizadas e incubado nas mesmas condições.

O volume obtido foi dividido em dois tubos de 1,5 mL aos quais foi acrescentado 625 µL clorofórmio-álcool isoamílico (24:1), sendo centrifugado por 20 minutos a 7300g em centrífuga refrigerada a 4 °C. A partir desta etapa, as amostras foram mantidas no gelo, para evitar a possível degradação do RNA nelas presente. A fase superior (aquosa) foi transferida para tubos novos e re-extraída com a solução de clorofórmio-álcool isoamílico, sendo centrifugado nas mesmas condições. A fase superior foi transferida para um tubo novo, ao qual foi adicionado 250 µL de cloreto de lítio (LiCl), sendo precipitada a -4 °C *overnight*, para a separação dos açúcares.

Após este período, as amostras foram centrifugadas a 13000g durante 30 minutos a 4 °C, sendo descartado cuidadosamente o sobrenadante. Foram adicionados 200 µL do tampão SSTE (1 M NaCl, 0.5% SDS, 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0) às amostras, sendo estas incubadas a 65 °C por 3 minutos. Posteriormente, foi realizado uma etapa de extração com 200 µL clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) através de centrifugação a 18000g durante 10 minutos a 4 °C. A fase superior foi transferida pra tubos novos e foi adicionado 18 µL de acetato de sódio (NaAc) 3M e 364 µL de etanol absoluto, sendo precipitada a -70 °C por uma hora. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 30 minutos a 18000g a 4 °C, sendo posteriormente descartado o sobrenadante cuidadosamente. O pellet foi lavado por duas vezes com etanol 70% e ressuspendido em 25 µL de solução de DEPC e 0.1 mM EDTA.

Os métodos M1 e M2 foram executados de acordo com os protocolos desenvolvidos pelos fabricantes. O método M4 refere-se a um kit comercial para extração de RNA total de tecidos vegetais, sendo executado conforme protocolo desenvolvido pelo fabricante. O método M5 é um kit comercial para extração de DNA que foi utilizado para extração de RNA. Para tanto, a etapa de digestão com RNase foi substituído por um passo de digestão com DNase. Para cada método, foram utilizadas três repetições de cada tecido.

Avaliação de pureza e quantificação de RNA

A pureza e a concentração RNA foram determinados em Nanovue Plus (GE Healthcare), as medidas de absorvância foram realizadas nos comprimentos de onda de 230, 260 e 280nm, sendo acompanhadas também as relações entre A260/A280 e A260/A230, que fornecem uma estimativa da pureza do ácido nucléico (SAMBROOK et al., 1989).

5. Resultados e Discussão

5.1. Caracterização molecular de genótipos de cana-de-açúcar utilizando marcadores SSR para identificação de variação somaclonal

Neste estudo foram avaliadas 30 amostras de DNA provenientes de plantas cultivadas *in vitro*, com o objetivo de identificar a ocorrência de variação somaclonal entre os clones gerados. A variação somaclonal é a variação genética que ocorre espontaneamente em plantas regeneradas *in vitro* e está relacionada diretamente à multiplicação celular. Este pode ser considerado um fenômeno natural que permite a ampliação de variabilidade para ser explorada por programas de melhoramento, podendo gerar até mesmo resistência e/ou tolerância a estresses bióticos e abióticos (RIBEIRO, 2012).

Entretanto, da mesma forma que este processo pode gerar alterações genéticas favoráveis, a variação somaclonal torna-se indesejada quando objetiva-se apenas a propagação clonal de um genótipo de interesse, como por exemplo um determinado clone em um evento de transformação genética. A utilização de marcadores SSR se destaca entre os demais na identificação genética de variedades por serem reprodutíveis, co-dominantes e multialélicos (RIBEIRO, 2012).

Em cana-de-açúcar, os marcadores SSR já foram utilizados, por exemplo, para acessar a variabilidade genética de coleções de germoplasma da cultura (CORDEIRO et al., 2003), para criar mapas genéticos da cultura, em associação com outros marcadores (XU et al., 1999; AITKEN et al., 2005) e para identificar somaclones resistentes a fungos (SHAHID et al., 2011).

Dentre os *primers* descritos na Tabela 1, não foi constatada variação somaclonal para os pares UGSM312, SCM18, SCM21, SMOS156, UGSM296, SCM27 e SCM32. O perfil de bandas obtidos com os *primers* UGSM312, SCM18 e UGSM296 pode ser observado nas figuras 1, 2 e 3 respectivamente.

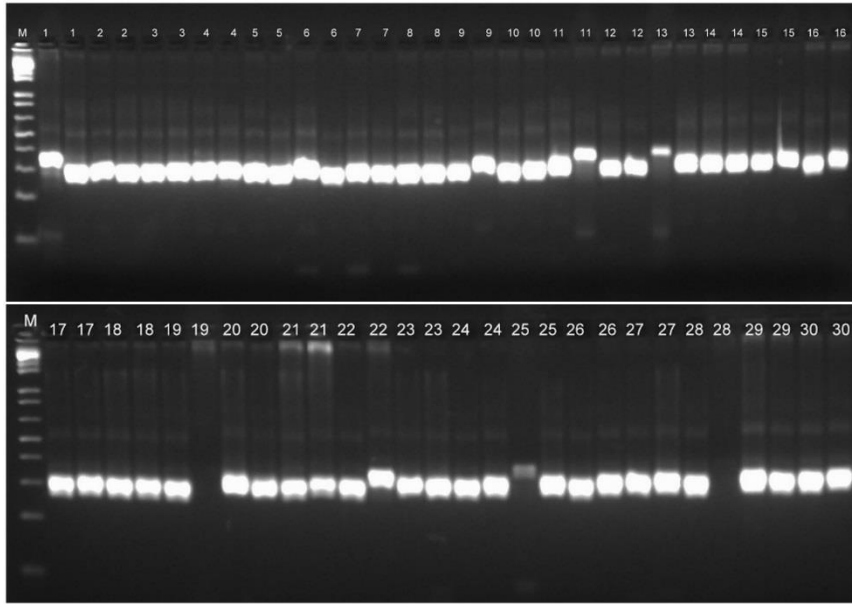


Figura 1: Imagem do perfil de bandas obtidas com o par de *primers* UGSM312, em gel de agarose 3%, para as 30 amostras de DNA analisadas, cada uma delas em duplicata, onde a letra M indica o marcador 1 kb plus.

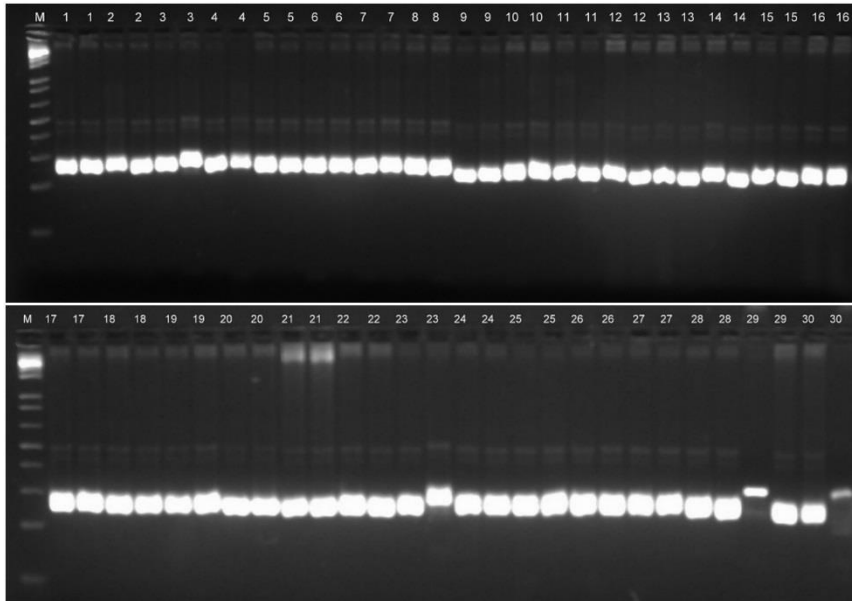


Figura 2: Imagem do perfil de bandas obtidas com o par de *primers* SCM18, em gel de agarose 3%, para as 30 amostras de DNA analisadas, cada uma delas em duplicata, onde a letra M indica o marcador 1kb plus.

As pequenas diferenças entre a altura das bandas foram consideradas resultantes de possíveis alterações na corrida eletroforética, como por exemplo, a interação de grande afinidade entre o corante Gel Red e o ácido nucléico, que pode resultar em atraso na migração de fragmentos quando é utilizada coloração pré-corrída ou quando o mesmo é adicionado à amostra, como no caso deste experimento, não estando relacionadas a diferenças entre as amostras. Os demais pares de *primers* se mostraram inconsistentes na identificação de variação somaclonal para as amostras utilizadas.

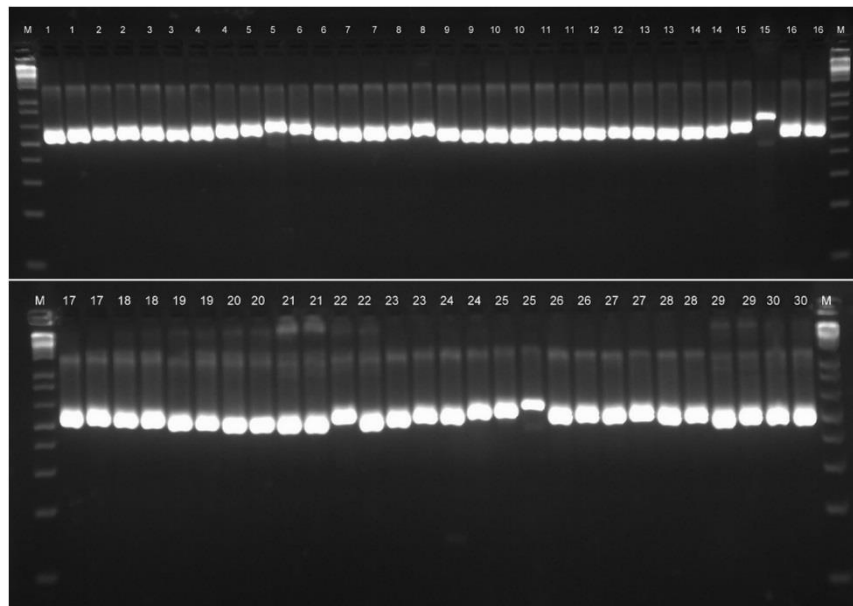


Figura 3: Imagem do perfil de bandas obtidas com o par de primers UGSM296, em gel de agarose 3%, para as 30 amostras de DNA analisadas, cada uma delas em duplicata, onde a letra M indica o marcador 1 kb plus.

5.2. Avaliação de protocolos de extração de RNA para diferentes tecidos de cana-de-açúcar

A avaliação da expressão genes por PCR em tempo real requer a obtenção de RNA em concentrações suficientes e com qualidade adequada. No entanto, os estudos avaliando a eficiência de métodos de isolamento de RNA a partir de amostras de diferentes tecidos de cana-de-açúcar são escassos. Desta forma, cinco métodos de isolamento de RNA comumente utilizados para diversos tecidos vegetais foram comparados quanto à eficácia na concentração e qualidade de RNA obtidos a partir de três tecidos de cana-de-açúcar, folhas novas, folhas velhas e colmo.

A concentração de RNA extraído através dos métodos avaliados pode ser observada na Figura 4. A maior quantidade de RNA extraído para todos os tecidos foi obtida com o método M2, seguido por M1 e M3.

Os métodos M4 e M5 apresentaram pouca diferença entre si, sendo inferiores aos demais. Ambos os métodos referem-se a kits de extração de RNA e DNA, respectivamente, que apesar da praticidade e rapidez na execução do método, resultam em quantidades menores de RNA, além de apresentarem um custo elevado. O método M5 foi testado por consistir em uma estratégia interessante quando se tem interesse na extração conjunta de DNA e RNA, já que os kits de extração de DNA são mais comumente utilizados em laboratórios de biologia molecular, e a adaptação do método à extração de RNA poderia reduzir custos.

É possível observar ainda que a diferença de eficácia de isolamento de RNA entre os métodos testados foi menor nas amostras de colmo. Além disso, a eficiência de extração de RNA foi menor nas amostras de colmo quando comparadas aos demais tecidos, para todos os métodos testados. Cabe salientar que o desvio padrão entre as réplicas mostrou-se pequeno em todos métodos e tecidos, exceto para M2, o que permite inferir quanto a confiabilidade destes.

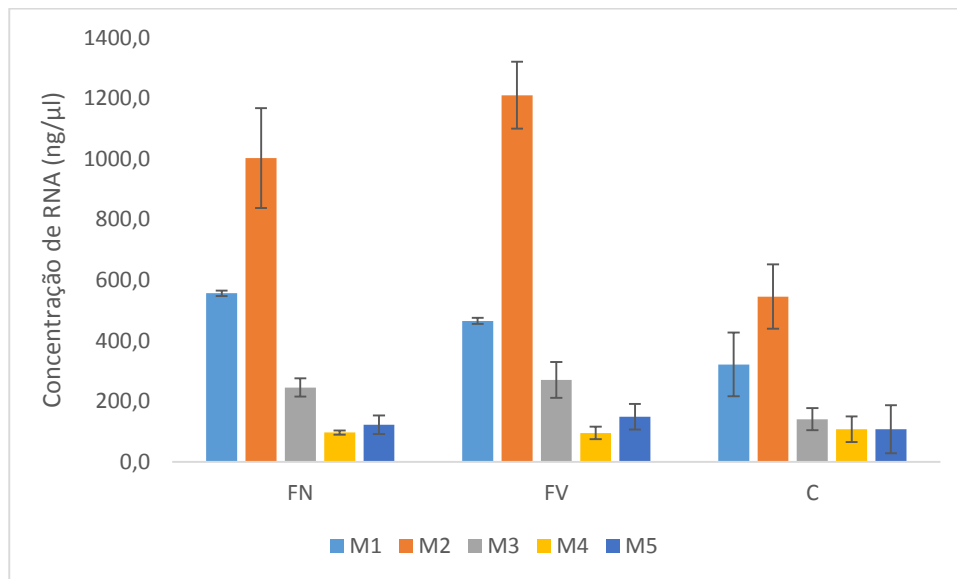


Figura 4: Concentração (ng/μl) de RNA extraído para os diferentes métodos testados (FN: folha nova; FV: folha velha; C: colmo).

A razão obtida entre as leituras espectrofotométricas no comprimentos de onda de 260nm e 280nm, ficou abaixo do esperado para amostras de RNA (entre 1,8 e 2,2) apenas para as amostras de folhas novas e colmos do M4, como pode ser observado na Figura 5. A razão da absorbância nestes comprimentos de onda fora da faixa esperada indicam contaminação por proteínas. Portanto, este resultado indica que as amostras extraídas, com exceção das citadas anteriormente, apresentam qualidade suficiente para

a sua utilização para síntese de cDNA, quando considerado apenas este parâmetro (LOGEMANN et al., 1987).

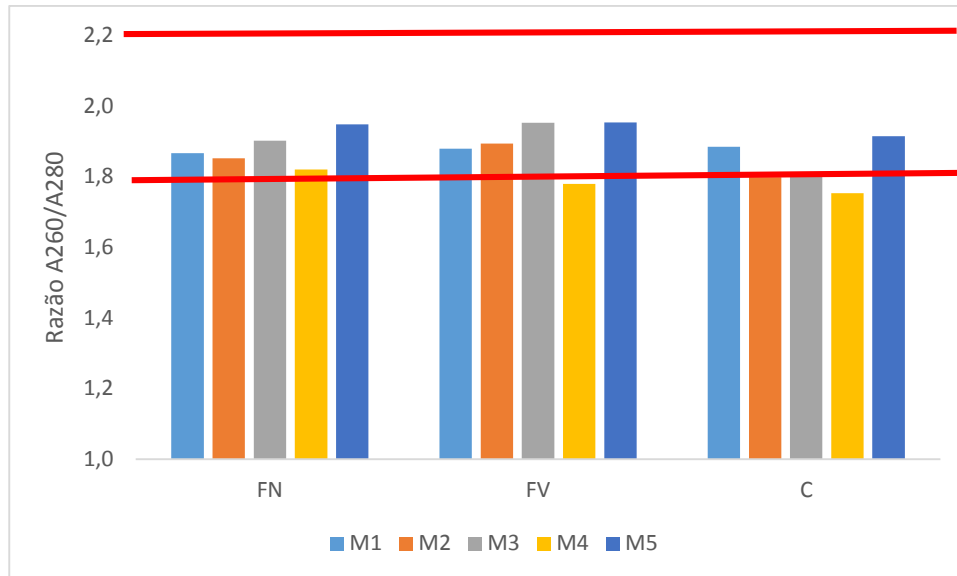


Figura 5: Relação A260/A280 nas amostras de RNA isolados de cinco métodos distintos a partir de folhas velhas (FV), folhas novas (FN) e colmo (C) de cana-de-açúcar.

Entretanto, quando analisada a razão obtida entre as leituras espectrofotométricas no comprimentos de onda de 260nm e 230nm, onde valores inferiores a 1,8 e superiores a 2,2 indicam a contaminação por compostos orgânicos, como o polifenóis e polissacarídeos, apenas o M1 apresentou a qualidade esperada, para todos os tecidos testados, como pode ser observado na Figura 6. Este parâmetro de avaliação é particularmente importante quando analisada a qualidade de amostras obtidas de tecidos vegetais que são ricos nestes compostos orgânicos, pois podem afetar a acurácia dos métodos de análise transcriptômica (BILGIN et al., 2009; FLEIGE et al., 2006).

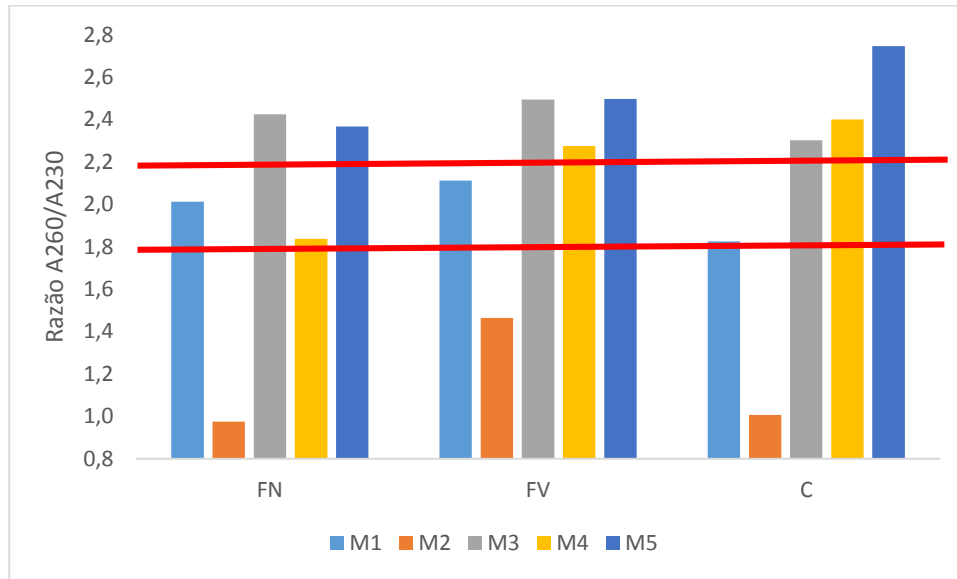


Figura 6: Relação A260/A230 nas amostras de RNA isolados de cinco métodos distintos a partir de folhas velhas (FV), folhas novas (FN) e colmo (C) de cana-de-açúcar.

Os resultados de concentração e qualidade (razões entre A260/A280 e A260/A230) do RNA isolado permitem inferir que o M1 foi o método mais eficiente entre os métodos testados, pois, apesar de apresentar uma concentração de RNA inferior ao M2 (método com maior concentração), apresentou melhores parâmetros de qualidade. O M2, que utiliza o reagente comercial TRIzol® Reagent (Invitrogen) já foi relatado como eficiente para extração de RNA de folhas cana-de-açúcar, mesmo que sem ser avaliada a razão A260/A230 por Barbosa (2008), Gimenez et al. (2010) e Ferreira (2008), discordando dos resultados obtidos no presente estudo, enquanto Bilgin et al. (2009) observaram resultados semelhantes, onde este método apesar de apresentar boa quantificação e razão entre A260/A230 ficou fora dos parâmetros de qualidade esperados. Apesar disso, este método não pode ser descartado quando necessária a extração de elevadas concentrações de RNA e há limitação no volume de amostra.

O M3, que consiste de um método baseado no extrator preparado em laboratório CTAB, modificado dos métodos propostos por Jaakola et al. (2001) para extração de RNA total de *Vaccinium myrtillus* e Chang et al. (1993) para amostras de pinheiro, apresentou concentrações de RNA extraído razoáveis para todos os tecidos, entretanto, a qualidade das amostras não foi adequada quando considerada a razão A260/A230.

Os kits comerciais M4 e M5 apresentaram os piores resultados de concentração de RNA extraído, sem a qualidade esperada.

6. Conclusões e Perspectivas

Nas condições desse estudo, os resultados obtidos na análise SSR dos genótipos de cana-de-açúcar não apontaram variação somaclonal nas amostras analisadas. Entretanto, para uma maior confiabilidade do resultado, novos primers deverão ser testados.

No ensaio de comparação de métodos de extração de RNA, o método que utiliza o reagente comercial Concert™ Plant RNA Reagent, se mostrou o mais eficaz, pois apesar de não ter sido o método que mais extraiu, apresentou os melhores parâmetros de qualidade. Para a confirmação dos resultados e avaliação complementar dos métodos, deverão ser realizados eletroforese em gel de agarose desnaturante, síntese de cDNA e análises de PCR em tempo real.

7. Referências Bibliográficas

- AITKEN, K.S.; JACKSON, P.A.; MCINTYRE, C.L. A combination of AFLP and SSR markers provides extensive map coverage and identification of homologous linkage groups in a sugarcane cultivar. **Theoretical and Applied Genetics**. n.110, v.5, p.789-801, 2005.
- ALBINO, J. C.; CRESTE, S.; FIGUEIRA, A. Mapeamento genético em cana-de-açúcar. **Biociência**. n.36, p.82-91, 2006.
- BARBOSA, A. C. D. R. **Modulação dos genes da nitrilase e do retrotransposon em cana-de-açúcar submetida a déficit hídrico**. 2008. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2008.
- BILGIN, D.D.; DELUCIA, E.H.; CLOUGH, S.J. A robust plant RNA isolation method suitable for Affymetrix GeneChip analysis and quantitative real-time RT-PCR. **Nature Protocols**. v.4, n.3, p.33-40, 2009.
- BRAMMER, S. P. **Marcadores moleculares: princípios básicos e uso em programas de melhoramento genético vegetal**. Passo Fundo, RS: Embrapa Trigo, 2000. Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/p_do03.htm>. Acesso em: 12 nov. 2013.
- BUSTIN, S.A.; NOLANB, T. Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *Journal of Biomolecular Techniques*. v.15, n.3, p.155-66, 2004.
- CHANG, S.; PURYEAR, J.; CAIRNEY, J. A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. **Plant Molecular Biology Reporter**. v.11, p.113-116, 1993.
- CHEAVEGATTI-GIANOTTO, A., DE ABREU, H. M. C., ARRUDA, P., BESPALHOK FILHO, J. C., BURNQUIST, W. L., CRESTE, S., DI CIERO, L., FERRO, J. A., DE OLIVEIRA FIGUEIRA, A. V., DE SOUSA FILGUEIRAS, T., GROSSI-DE-SÁ, M. D. F., GUZZO, E. C., HOFFMANN, H. P., DE ANDRADE LANDELL, M. G., MACEDO, N., MATSUOKA, S., DE CASTRO REINACH, F., ROMANO, E., DA SILVA, W. J., DE CASTRO SILVA FILHO, M. & CÉSAR ULIAN, E. (2011). Sugarcane (*Saccharum X officinarum*): A reference study for the regulation of genetically modified cultivars in Brazil. **Tropical Plant Biology**. v.4, n.1, p.62-89, 2011.

CHEN, W. H.; GARTLAND, K. M. A.; DAVEY, M. R.; SOTAK, R.; GARTLAND, J. S.; MULLIGAN, B. J.; POWER, J. B.; COCKING, E. C. Transformation of sugarcane protoplasts by direct uptake of a selectable chimeric gene. **Plant Cell Reports**. v.6, p.297–301, 1987.

CIB. **Guia da Cana-de-açúcar**. Conselho de informações sobre biotecnologia. Disponível em: <<http://cib.org.br/biotec-de-a-a-z/publicacoes/guia-da-cana-de-acucar/>> Acesso em: 21 out. 2013.

CONAB. Acompanhamento de safra brasileira: cana-de-açúcar, segundo levantamento, agosto/2013. – Brasília, DF: Companhia Nacional de Abastecimento, 2013b. Disponível em:

<http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_08_08_09_39_29_boletim_cana_portugues_-_abril_2013_1o_lev.pdf> Acesso em: 13 Nov. 2013.

CORDEIRO, G. M.; CASU, R.; MCINTYRE, C. L.; MANNERS, J. M.; HENRY, R. J. Microsatellite markers from sugarcane (*Saccharum spp.*) ESTs cross transferable to erianthus and sorghum. **Plant Science**. v.160, p.1115–1123, 2001.

CORDEIRO, G. M.; PAN, Y. B.; HENRY, R. J. Sugarcane microsatellites for the assessment of genetic diversity in sugarcane germplasm. **Plant Science**. v.165, p.181-189, 2003.

D'HONT, A.; SOUZA, G. M.; MENOSSI, M.; VINCENTZ, M.; VAN-SLUYS, M.A.; GLASZMANN, J. C.; ULIAN, E. Sugarcane: a major source of sweetness, alcohol, and bio-energy. In: Moore, P.H.; Ming, R. (org) **Plant genetics and genomics: crops and models**. Nova Iorque: Springer, 2008. p. 483–513.

DILLON, S.L.; SHAPTER, F.M.; ROBERT, H.J.; CORDEIRO, G.; IZQUIERDO, L.; LEE, S.L. Domestication to crop improvement: genetic resources for Sorghum and Saccharum (Andropogoneae). **Ann Bot**. n.5, p.975–989, 2007.

EMBRAPA. **Novas tecnologias para produção de cana-de-açúcar**. Pelotas, RS: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 2013. Disponível em: <<http://www.cpact.embrapa.br/linha/2013/Linha-844-encarte.pdf>>. Acesso em: 14 Dez. 2013.

ENRIQUEZ-OBREGÓN, G. A., VÁZQUEZ-PADRÓN, R.I., D. L. PRIETO-SAMSONOV, DE LA RIVA, G.A. Herbicide-resistant sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) plants by Agrobacterium-mediated transformation. **Planta**. n.206, p.20-27, 1998.

FAO. **Strong global demand underpins world sugar prices**. FOOD OUTLOOK. 2009. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/011/ai482e/ai482e07.htm>>. Acesso em: 25 out. 2013.

FERREIRA, B. S. **Expressão diferencial de genes envolvidos a resposta ao estresse salino em cana-de-açúcar (*Saccharum sp.*) e arroz (*Oryza sativa*)**. 2008. 149f. Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia). Centro de Biociências e Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Campos dos Goytacazes, 2008.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2.ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEM, 1996.

FLEIGE, S.; PFAFFL, M. W. RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. **Molecular aspects of medicine**. v.7, n.2-3, p.126-39, 2006.

FNP. AGRIANUAL 2009 – Anuário da Agricultura Brasileira. São Paulo. p 497, 2009.

GIMENEZ, D. F. J.; MORAES, F. E.; LAIA, M. L.; DABBAS, K. M.; NODA, R. W.; SUZUKI, J.; ZINGARETTE, S. M.; FERRO, M. I. T. Análise da expressão gênica em cana-de-açúcar submetida ao estresse hídrico utilizando a técnica de macroarranjo de cDNA. **Científica**. v.38, n.1/2, p.57 – 68, 2010.

HELLER, M.J.DNA microarray technology: devices, systems, and applications. **Annual Review of Biomedical Engineering**. n.4, p.129-53, 2002.

IBGE. Indicadores IBGE: Estatística da Produção Agrícola, setembro de 2013. – Brasília/DF: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2013. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/estProdAgr_201309.pdf> Acesso em: 14 dez. 2013.

JAAKOLA, L.; PIRTTILA, A. M.; HALONEN, M.; HOHTOLA, A. Isolation of high quality RNA from bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) fruit. **Molecular Biotechnology**. v.19, p.201-203, 2001.

JACKSON, P.A. Breeding for improved sugar content in sugarcane. **Field Crops Research**. v.92, n.2–3, p. 277–290, 2005.

KASUGA, M.; MIURA, S.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. A combination of the *Arabidopsis* DREB1A gene and stress-inducible *rd29A* promoter improved drought and low temperature stress tolerance in tobacco by gene transfer. **Plant Cell Physiology**, v. 45, n. 3, p.346-350, 2004.

LIU, X. B., W. V. Differential Expression of Genes Regulated in Response to Drought or Salinity Stress in Sunflower. **Crop Science**. v. 45, n. 2, p. 678-687, 2003.

LOGEMANN, J.; SCHELL, J.; WILLMITZER, L. Improved method for the isolation of RNA from plant tissues. **Analytical Biochemistry**. v.163, p.16-20, 1987.

MAGRO, F. J.; TAKAO, G.; CAMARGO, P. E.; TAKAMATSU, S. T. **Biometria em cana-de-açúcar**. Piracicaba-SP: Universidade de São Paulo - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2001. Disponível em: <<http://www.lpv.esalq.usp.br/lpv0684/Biometria%20em%20cana-de-acucar%20exemplo%20de%20texto%20aluno.pdf>>. Acesso em: 14 nov. 2013.

MARTIN, J. P. The anatomy of the sugar cane plant. In: MARTIN, J. P.; ABBOT, E. V.; HUGHES, C. G. (Org) **Sugarcane Diseases of the World**. Amsterdam: Elsevier, v.1, p.3–52, 1961.

MOORE, P. H. Anatomy and morphology. In: **Sugarcane improvement through breeding**. Amsterdam: Elsevier, 1987. p. 85–142.

MOORE, P. H.; NUSS, K. J. Flowering and flower synchronization. In: Heinz, D. J. (Org) **Sugarcane improvement through breeding**. Amsterdam: Elsevier, pp 273–311, 1987.

- PANDEY, A.; SOCCOL, CR.; NIGAM, P.; SOCCOL, V. T.; Biotechnological potential of agroindustrial residues-I: sugarcane bagasse, **Bioresource Technology**. n. 74, p. 69-80, 2000.
- QUIANG, L. N., Z.; YAMAGUCHSHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Regulatory role of DREB transcription factors in plant drought, salt and cold tolerance. **Chinese Science Bulletin**. v.45, n.11, p.970-975, 2000.
- RIBEIRO, A. P. **Micropropagação, avaliação da variação somaclonal e detecção de vitus em videira**. 129f. 2012. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitotecnia). Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, Universidade Federal de Lavras, 2012.
- ROACH, B.T. Nobilization of sugarcane. **Proc. Int. Soc. Sugar Cane Technol.**, v.14, p.206-216, 1972.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATS, T. **Molecular cloning: A laboratory manual**. Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- ALMEIDA, C. M. A.; LIMA, S. E. N.; LIMA, G. S. A.; BRITO, J. Z.; DONATO, V. M. T. S.; SILVA, M. V. Caracterização molecular de cultivares de cana-de-açúcar utilizando marcadores ISSR. **Ciência e Agrotecnologia**. v.33, p.1771 -1776, 2009
- SHAHID, M.T.; KHAN, F.A.; SAEED, A.; FAREED, I. Variability of red rot-resistant somaclones of sugarcane genotype S97US297 assessed by RAPD and SSR. **Genetics and Molecular Research**. n.10, v.3, p.1831-49, 2011.
- SILVA, E. T.; SOUZA, E. P.; SANTOS, R. S.; BARBOSA, M. S. A engenharia genética aplicada no melhoramento da cana-de-açúcar: uma nova alternativa para a produção de biodiesel de segunda geração. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**. v.9, n.2, p.03-23, 2011
- SINGH, R. K.; MISHRA, S. K.; SINGH, S. P.; MISHRA, N.; SHARMA, M. L. Evaluation of microsatellite markers for genetic diversity analysis among sugarcane species and commercial hybrids. **Australian Journal of Crop Science**. v.4, n.2, p.116-125, 2010.
- STOLF, R. **Identificação e análise da expressão de genes relacionados com tolerância à seca em soja através de microarranjos de DNA e PCR em tempo real**. 2007. 159f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2007.
- ULIAN, E. C. Desenvolvimento de variedades geneticamente modificadas visando tolerância ao estresse híbrido. In: **V Workshop de Melhoramento Genético e Biotecnologia da Cana-de-Açúcar**, 2007.
- XIN, Z.; BROWSE, J. Cold comfort farm: the acclimation of plants to freezing temperatures. **Plant, Cell & Environment**. v.23, n.9, p.893–1003, 2000.
- XIONG, L.; SCHUMAKER, K. S.; ZHU, J. K. Cell signaling during cold, drought, and salt stress. **Plant Cell**. v.14, p.S165–S183, 2002.
- XU, M.L.; MELCHINGER A.E.; XIA, X.C.; LÜBBERSTEDT, T. High-resolution mapping of loci conferring resistance to sugarcane mosaic virus in maize using RFLP, SSR, and AFLP markers. **Molecular & General Genetics**.n.261, v.3, p.574-581, 1999.

XU, Y. **Molecular Plant Breeding**. Wallingford: CABI, 2010.