UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Centro de Desenvolvimento Tecnológico – CDTec

Curso de Graduação em Biotecnologia

Trabalho de Conclusão de Curso

Estudos preliminares em biologia molecular na espécie *Arundo donax* L. para a caracterização de sua diversidade genética

Liliane Silveira Varnes

Pelotas, 2018

Liliane Silveira Varnes

Estudos preliminares em biologia molecular na espécie *Arundo donax* L. para a caracterização de sua diversidade genética

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Centro de Desenvolvimento Tecnológico – CDTec da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientadora: Profª Dra. Luciana Bicca Dode

Pelotas, 2018

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas

Catalogação na Publicação

V317e Varnes, Liliane Silveira

Estudos preliminares em biologia molecular na espécie Arundo donax L. para a caracterização de sua diversidade genética / Liliane Silveira Varnes ; Luciana Bicca Dode, orientadora. — Pelotas, 2018.

55 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Biotecnologia) — Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, 2018.

1. Culturas agroenergéticas. 2. Ctab. 3. Ssr. 4. Quantificação. I. Dode, Luciana Bicca, orient. II. Título.

CDD : 574.88

Elaborada por Ubirajara Buddin Cruz CRB: 10/901

Liliane Silveira Varnes

Estudos preliminares em biologia molecular na espécie *Arundo donax* L. para a caracterização de sua diversidade genética

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: 29/11/2018

Banca Examinadora:

.....
Profª. Dra. Luciana Bicca Dode (Orientadora)
Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

.....
Profª. Dra. Vanessa Galli
Doutora em Biologia Celular e Molecular pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

.....
Dra. Juliana Silva Lemões
Doutora em Química pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

.....
Msc. Lucas Silva Lemões
Mestre em Agronomia pela Universidade Federal de Pelotas

“Dedico este trabalho à minha mãe, que nunca deixou de acreditar em mim, mesmo quando eu já não acreditava mais.”

Agradecimentos

À minha mãe, minha primeira e maior professora – que desde cedo, me ensinou que eu deveria lutar sempre pelo melhor para mim, que mesmo de longe me incentivou a continuar até aqui – e que sem a ela, eu não teria chegado a lugar nenhum.

À minha amiga Bruna, que mesmo com a distância, sempre esteve disposta para mim, para me ouvir, ajudar e divertir – e que compreendeu as minhas ausências.

À Professora Luciana - a primeira pessoa a acreditar no meu potencial e a investir seu conhecimento, tempo e confiança em mim – eu agradeço à todas as oportunidades que me deu, à tua paciência comigo e principalmente pelos conselhos de vida.

Ao meu orientador Sérgio, por todo aprendizado, oportunidade, pela confiança e também pela paciência – mesmo que às vezes sejamos teimosos e não façamos um quadro de análise de variância – e por mesmo assim, investir tempo e energia em tentar nos tornar os melhores acadêmicos e futuros pesquisadores possíveis.

À Cândida, por tudo que ela já nos ensinou e ajudou, por ser tão paciente com nós e por ser uma companhia tão agradável, divertida, pelas boas conversas – e também por ser uma pessoa que nos deixa feliz de ter por perto.

Aos meus amigos da Agroenergia Thaís, Lucas, Adílson e William, por toda ajuda com meu trabalho, por todos os conselhos e por todas as risadas que fizeram esse período mais suportável (e alegre) de viver.

Aos meus amigos que a Biotecnologia me trouxe, Aury e Carols (as duas!) fico grata por ter dividido esses quatro anos com vocês, que me renderam tantas memórias boas da graduação e fizeram ela ser mais jocosa.

À minha amiga Fernanda, com quem dividi a casa e esses quatro anos – sou grata pelas coisas boas, mas principalmente por não ter me deixado pra trás quando as coisas ficaram difíceis. Agradeço a convivência, pela paciência e pela harmonia.

À minha amiga Luize, que foi minha primeira amiga na graduação – e que não saiu do meu lado, dividindo a maior parte dos momentos, memórias,

amizades, alegrias e derrotas durante todo esse tempo – agradeço pela tua amizade, por toda ajuda e por tudo mais – principalmente por ter sido minha dupla desde 2015!

À pessoa que suportou todos meus momentos difíceis nesse período final, Rafael, me ajudando de todas as formas possíveis e por ter sido a pessoa mais paciente do mundo mesmo que eu esteja cansada, triste ou de mau humor, por fazer tudo ao seu alcance pra tornar tudo isso mais suportável e por me incentivar a não desistir não importa o que aconteça – sou grata por ter você ao meu lado nesse momento.

Agradeço também ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Embrapa Clima Temperado pelo apoio financeiro e incentivo à pesquisa.

VARNES, Liliane Silveira. **Estudos preliminares em biologia molecular na espécie *Arundo donax* L. para a caracterização de sua diversidade genética**. 2018. 55f. Trabalho de Conclusão de Curso – Curso de Bacharelado em Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2018.

Resumo

A espécie *Arundo donax* L. apresenta grande potencial de utilização como matéria-prima para a produção de biocombustíveis. Considerando a necessidade da substituição dos combustíveis fósseis por fontes de energia renováveis, é de grande importância o melhoramento genético de culturas agroenergéticas. Levando em conta a complexidade do genoma da espécie, é necessário o desenvolvimento de protocolos específicos para atender às particularidades da mesma. O objetivo deste trabalho é selecionar um protocolo de extração de DNA de *A. donax* L., para caracterização da diversidade genética da espécie e estabelecer os acessos coletados. Foram coletados 52 acessos no estado do Rio Grande do Sul, estabelecidos em ambiente telado protegido para compor o Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Clima Temperado. A extração de DNA dos acessos foi feita adotando-se três protocolos diferentes: CTAB modificado Ferreira e Grattapaglia (1996), Dellaporta modificado por Arriel et al. (2002) e o Kit comercial Purelink Plant Total DNA Purification Kit da Invitrogen, para determinar qual o mais adequado. A quantificação do DNA obtido foi determinada através da visualização em géis de agarose e por espectrofotometria no aparelho Nano Vue® Plus. Os resultados obtidos mostraram que o método mais eficiente para a extração de DNA em *A. donax* L. é o protocolo CTAB, com a adição de proteinase K, sendo necessário mais ajustes ao protocolo para obter amostras de melhor qualidade.

Palavras-chave: culturas agroenergéticas; CTAB; SSR; quantificação.

VARNES, Liliane Silveira. **Preliminary studies in molecular biology in the species *Arundo donax L*. for a characterization of its genetic diversity.** 2018. 55s. Term Paper - Bachelor of Biotechnology, Center for Technological Development, Federal University of Pelotas, Pelotas, 2018.

Abstract

The species *Arundo donax L*. presents great potential of use as raw material for the production of biofuels. Considering the need to replace fossil fuels with renewable energy sources, the genetic improvement of agroenergy crops is of huge importance. Considering the complexity of the species genome, it is necessary to develop specific protocols to meet the particularities of the species. The main objective of this study is to select a DNA extraction method for *A. donax L.*, to characterize the genetic diversity of the species. We collected 52 accessions in the state of Rio Grande do Sul, established in a protected environment to compose the Active Bank of Germplasm from Embrapa Clima Temperado. The DNA extraction of the accessions was performed by adopting three different protocols: Ferreira e Grattapaglia (1996) modified CTAB, Dellaporta modified by Arriel et al. (2002) and comercial kit Purelink Plant Total DNA Purification Kit (Invitrogen®), to determine which one is the most appropriate. Quantification of the obtained DNA was determined by visualization on agarose gels and by spectrophotometry on the Nano Vue® Plus device. The results showed that the most efficient method for DNA extraction in *A. donax L*. is the CTAB protocol with the addition of proteinase K, and more adjustments to the protocol are required to obtain better quality samples.

Key-words: Agroenergy crops; CTAB; SSR; quantification.

Lista de Figuras

Figura 1	Ilustração da estrutura botânica de *Arundo donax* L.	19
Figura 2	Foto de rizoma de *Arundo donax* L. com brotação, pronto para plantio em recipiente.	25
Figura 3	Fluxograma das etapas de extração de DNA pelo método CTAB adaptado.	27
Figura 4	Fluxograma das etapas de extração de DNA do protocolo Dellaporta adaptado.	29
Figura 5	Imagem obtida através do programa *Google Earth*, mostrando a localização de pontos de coletas de *Arundo donax* L. na cidade de Pelotas/RS.	38
Figura 6	Imagem obtida através do programa *Google Earth*, mostrando a localização de pontos e coletas de *Arundo donax* L. dentro do estado do Rio Grande do Sul.	38
Figura 7	Acessos de *Arundo donax* L. desenvolvidos em ambiente telado coberto	39
Figura 8	Acessos de *Arundo donax* L. após a poda das mudas para padronização da altura, em ambiente telado coberto.	40
Figura 9	Gel de agarose demonstrando a presença de bandas de DNA, degradação das amostras e forte presença de contaminante.	41
Figura 10	Gel de agarose 1% demonstrando a presença de bandas de DNA e a redução da concentração de contaminantes nas amostras.	41
Figura 11	Gel de agarose para a quantificação das amostras após a extração pelo protocolo de Arriel et al. (2002).	42
Figura 12	Gel de agarose para quantificação de amostras provenientes da extração de DNA utilizando o kit comercial da Invitrogen®. Apenas duas bandas são visíveis no gel.	42

Figura 13 Quantificação em gel de agarose 1% das amostras de DNA provenientes dos três protocolos utilizados: A) CTAB; B) Dellaporta; C) Kit comercial. 45
Figura 14 Imagem de gel de agarose para visualizar a presença de bandas após a amplificação. A) Amostras de *A. donax* L.; B) Amostras de cana-de-açúcar. 46

Lista de Tabelas

Tabela 1 Conjunto de *primers* de cana-de-açúcar testados na espécie *Arundo donax* L., com sua identificação, a sequência *forward* e *reverse* dos *primers*, e a temperatura de anelamento correspondente a cada um. 31

Tabela 2 *Primers* SSR de *Arundo donax* L., contendo o nome do locus, a sequência de primers (*Forward* e *Reverse*), o número de acesso da sequência no GenBank e temperatura ótima de anelamento. 33

Tabela 3 Acessos de *Arundo donax* L. coletados no período de abril a setembro de 2018, apresentando o número dos acessos, a data da coleta, o local, as coordenadas geográficas da localização e a altitude em que se encontra. 35

Tabela 4 Tabela com dados referentes às leituras da quantidade de DNA presente nas amostras extraídas a partir dos diferentes protocolos de extração de DNA, medido em ng/µL, apresentando o método de extração, o número da amostra, as referentes leituras e a média das mesmas. 44

Lista de Abreviaturas e Siglas

1G – Primeira Geração

2G – Segunda Geração

3G – Terceira Geração

AFLP - *Amplified Fragment Lenght Polymorphism*

AL – Alagoas

CIA - Clorofórmio Álcool isoamílico

CTAB – Brometo de Cetrimônio

CV – Coeficiente de Variância

DNA – Ácido desoxirribonucleico

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

HCl – Ácido clorídrico

ISSR – *Inter Simple sequence repeats*

KOH – Hidróxido de Potássio

LQ – Limite de quantificação

NaCl – Cloreto de Sódio

PCR – *Polymerase chain reaction*, reação em cadeia da polimerase.

RAPD - *Random amplified polymorphism DNA*

RFLP - *Restriction fragment lenght polymorphism*

RNA – Ácido ribonucleico

Rpm – Rotações por minuto

RS – Rio Grande do Sul

SDS - Dodecil sulfato de sódio

Spp. - Espécies

SSR – *Simple sequence repeats*

TE – Tris-EDTA

Sumário

1 Introdução 13

2 Objetivos 15

2.1 Objetivo geral 15

2.2 Objetivos específicos 15

3 Revisão Bibliográfica 16

3.1 *Arundo donax* L. 16

3.1.1 Taxonomia e Morfologia 18

3.1.2 Constituição Bioquímica 20

3.2 Biomassa e Bioenergia 21

3.3 Biologia Molecular 23

3.3.1 Marcadores Moleculares 24

4 Materiais e Métodos 26

4.1 Coleta de Acessos 26

4.2 Registro e manutenção dos acessos 26

4.3 Extração de DNA 27

4.4 Quantificação do DNA 31

4.5 Teste de primers de cana-de-açúcar 31

4.6 Seleção e confecção de primers SSR 33

5 Resultados e Discussão 35

5.1. Coleta de acessos de *A. donax* L. 35

5.2. Estabelecimento de coleção de acessos 40

5.3. Protocolos de extração de DNA de *A. donax* L. 41

5.4. Quantificação de amostras de DNA de *A. donax* L. 44

5.5 Teste de *primers* de cana-de-açúcar 46

6 Considerações finais 48

7 Referências Bibliográficas 49

1 Introdução

A espécie *Arundo donax* L., também conhecida como cana-brava, cana-do-reino ou *giant reed* (cana gigante) (AL-SNAFI, 2015), é uma gramínea de metabolismo C3, reprodução assexuada e crescimento rápido e vigoroso, muitas vezes atingindo cerca de 8 m de altura (PILU et al., 2014). Apesar de ser considerada uma espécie invasiva em diversas localidades (HERRERA e DUDLEY, 2003) devido à sua facilidade em resistir a condições ambientais muitas vezes inadequadas para o crescimento de outras espécies de plantas, e ao acelerado crescimento (PILU et al., 2012).

Ainda que a propagação e cultivo do *Arundo donax* L. seja controvérsia por ser uma espécie invasiva, é rico em biomassa e suas características, principalmente quanto à propagação e crescimento, o tornam uma interessante cultura agroenergética, podendo aplicar seu rendimento em biomassa para a obtenção de biocombustíveis (VILLANUEVA e LILIANA, 2016).

Características como a sua reprodução assexuada a partir de brotações laterais (BOLAND, 2006; PILU et al., 2012), inviabilidade das sementes e baixa variabilidade genética (SALTONSTALL, LAMBERT e MEYERSON, 2010) tornam o melhoramento dessa cultura e estudos sobre seu genoma mais complexos.

Com a crescente demanda por fontes energéticas renováveis, a necessidade de substituição dos combustíveis fósseis e o apelo à preservação do meio ambiente e seus recursos, é de extrema importância o investimento e pesquisa em desenvolvimento de biocombustíveis e melhoramento de culturas agroenergéticas.

Para o melhoramento genético de culturas agroenergéticas como o *Arundo donax* L., é necessário ter conhecimento sobre o seu genoma e sobre como seus genes expressam fenotipicamente características de interesse para a sua utilização como fonte de energia para a geração de biocombustíveis. Sendo assim, a diversidade genética é importante e desejável para selecionar traços de interesse, como altos rendimentos de biomassa e adaptabilidade a diversos locais (TOUCHELL et al., 2016).

Contudo, a complexidade do genoma dessa espécie dificulta sua análise molecular, dificultando também o estabelecimento de protocolos específicos. Sendo assim, é de fundamental importância padronizar cada etapa que envolve a caracterização da diversidade genética dessa espécie, levando em conta a singularidade da sua composição bioquímica e complexidade genômica, otimizando assim os estudos moleculares e citogenéticos dessa espécie, que servirão como base para o melhoramento da mesma.

Neste contexto, uma etapa fundamental na caracterização da diversidade genética de qualquer espécie é a extração de ácido desoxirribonucleico (DNA) – que deve garantir quantidade e qualidade adequadas, sem qualquer tipo de contaminante, para posteriores análises.

Apesar de haverem inúmeros protocolos para a extração do DNA total de plantas, refletindo a variabilidade da composição química de diferentes espécies e tecidos (Romano e Brasileiro, 1998), há espécies que necessitam do desenvolvimento de protocolos específicos, ou de adaptações nos protocolos já existentes para atender à necessidade de obtenção de DNA puro para diversos fins, sanando problemas individuais devido às suas composições e aplicações.

2 Objetivos

2.1. Objetivo geral

Selecionar um protocolo de extração de DNA para a espécie *Arundo donax* L, visando a caracterização de sua diversidade genética utilizando sequências microssatélites.

2.2. Objetivos específicos

Coletar acessos de *Arundo donax* L em diferentes locais, altitudes e características ambientais e estabelecer a coleção de acessos para compor um banco ativo de germoplasma de *Arundo donax* L. na Embrapa Clima Temperado;

Testar e comparar protocolos de extração de DNA e selecionar qual o mais adequado para *Arundo donax* L.;

Quantificar as amostras obtidas a partir dos métodos de extração de DNA;

3 Revisão Bibliográfica

3.1 *Arundo donax* L.

A espécie *Arundo donax* L., também conhecida como cana-do-reino, *giant reed* (cana gigante) ou cana-brava (AL-SNAFI, 2015), pertence à família das Poaceae e foi descrita em 1753 por Lineu na França e Espanha (HARDION et al., 2014). É uma gramínea rizomatosa, de ciclo de vida perene, metabolismo fotossintético C3, que pode alcançar até 8 m de altura (PILU et al., 2014).

Existe a hipótese de que a espécie se originou do cruzamento de *Arundo plinii* com uma espécie tetraploide (desconhecida) ou através do cruzamento de *A. plinii* com *Phragmites australis* (BUCCI et al., 2013). Sua origem não é bem estabelecida, onde evidências apontam que possa ter surgido no Mediterrâneo (ZEVEN e WET, 1982; WAGNER et al., 1999; MARIANI et al., 2010) enquanto há autores que acreditam que sua origem se deu na Ásia (ROSSA et. al., 1998; LEWANDOWSKI et. al., 2003) e através disso tenha se disseminado através do Mediterrâneo para outros continentes, sendo considerada uma espécie invasiva em muitos locais (HERRERA e DUDLEY, 2003), principalmente regiões quentes ou de clima subtropical (PERDUE, 1958).

Apesar de produzir sementes, estas não são viáveis, não permitindo a reprodução sexuada de *Arundo donax* L. (PERDUE, 1958; MARIANI et al., 2010), reproduzindo-se apenas de maneira agâmica, o que fez com que sua disseminação seja rápida e de difícil controle devido à propagação vegetativa (PILU et al., 2014). Acredita-se que os fragmentos de caule ou de rizoma possam ser carregados na água, em inundações, ou até mesmo pela ação humana, contribuindo para sua propagação de maneira involuntária (por exemplo, em escavações) ou voluntária com sua propagação para atividades domésticas (PILU et al., 2012; BUCCI et al., 2013), como ornamental.

Além disso, o arundo apresenta várias utilizações, sendo usado também para a fabricação de palhetas para instrumentos de sopro, cercas, cestas e varas de pesca e também como estaca para a sustentação de outras plantas (BUCCI et al., 2013). Industrialmente, também foi utilizado para a produção de celulose, viscose e papel (PERDUE, 1958; MARIANI et al., 2010; PILU et al., 2012).

O maior interesse industrial dessa planta concentra-se no seu potencial como cultura agroenergética. Devido à sua biomassa abundante, possui

importantes aplicações na produção de energia e biocombustíveis, como a combustão da sua biomassa e produção de etanol de 2ª geração (VILLANUEVA e LILIANA, 2016), podendo ser gaseificada, sofrer pirólise (GHETTI, RICCA e ANGELINI, 1996; PILU et al., 2012), ser submetida a fermentação alcóolica para produzir bioetanol (JEON, XUN e ROGERS, 2010; LEMONS E SILVA et al., 2015) ou produzir biogás através de digestão anaeróbia (PILU et al., 2012; CORNO et al., 2015).

Também é uma planta muito utilizada para estudos de fitorremediação e recuperação de áreas degradadas, devido à sua adaptabilidade a inúmeras condições de solo, vigor e rápido crescimento (PILU et al., 2012).

3.1.1 Taxonomia e Morfologia

Arundo donax L. pertence à família das Poaceae – constituída pelas gramíneas, subfamília Arundinoideae, do gênero *Arundo* e se caracteriza por sua altura, rigidez dos colmos, propagação através dos rizomas e afinidade por zonas úmidas (HARDION et al., 2012) composto por seis espécies (SALTONSTALL, LAMBERT e MEYERSON, 2010), onde a espécie *Arundo donax* L. é a mais difundida e mais conhecida. É caracterizado como monocotiledônea, sendo considerada uma das espécies mais altas entre as Poaceae, podendo crescer até 8 m e suas raízes fasciculadas podem atingir até 5 m de profundidade. (PERDUE, 1958).

As raízes surgem através de rizomas fibrosos e compactos em sua porção basal, contendo gemas que facilitam a formação de grandes populações dessa planta através da propagação dos caules modificados (PERDUE, 1958; AL-SNAFI, 2015).

Os rizomas são o suporte dos colmos longos e eretos dessa planta, similares a bambus, que apresentam diâmetros entre 1 e 4 cm, normalmente de coloração verde, mas mudando para amarelado quando a planta entra em estado de semi-dormência ou durante períodos de seca. Além disso, o tecido externo do seu colmo é duro e quebradiço, de superfície lisa e brilhosa (PERDUE, 1958).

O colmo é dividido pelos nós, que também podem ser utilizados para sua propagação. As folhas se distribuem de maneira alternada ao longo do colmo, apresentando coloração, com a presença de pelos na base e afinando até chegar na ponta, com aproximadamente 70 cm de comprimento (AL-SNAFI, 2015). Na porção apical, apresentam flores em forma de panícula (PERDUE, 1958), de coloração marrom ou creme (AL-SNAFI, 2015), conforme a estrutura da planta ilustrada na Figura 1. Apesar de possuir inflorescências, as flores não apresentam pólen ou sementes (LEWANDOWSKI et al., 2003; JOHNSON, DUDLEY e BURNS, 2006) em muitos locais, tornando-a uma planta estéril. Por causa disso, a reprodução dessa planta é de maneira agâmica, através da

propagação de rizomas e brotações a partir das gemas dos nós (BOLAND, 2006; PILU et al., 2012).

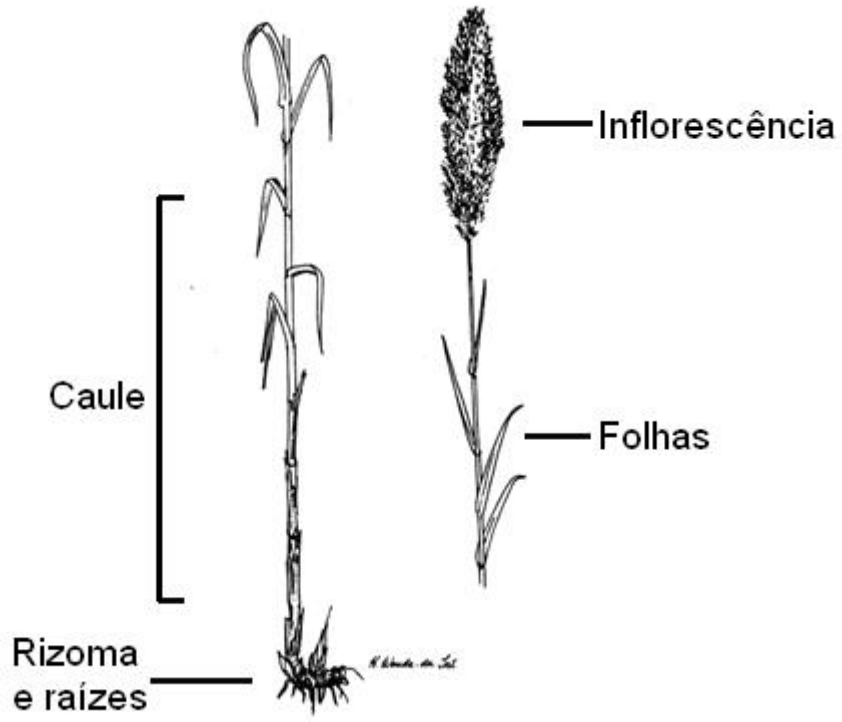

Figura 1. Ilustração da estrutura botânica de *Arundo donax* L.

Fonte: Adaptado de WATSON, L.; MACFARLANE, T.D.; DALLWITZ, M.J. (1992). Disponível em: <*https://www.delta-intkey.com/grass/www/arundo.htm*>.

Acredita-se que a infertilidade das sementes de *Arundo donax* L. seja pela planta possivelmente ter se originado do cruzamento de duas espécies, gerando um híbrido estéril alopoliplóide. O número exato de cromossomos na espécie ainda gera debates, variando de 40 a 110 cromossomos (BUCCI, 2013). A dificuldade de caracterizar o número de cromossomos dessa espécie se dá devido ao tamanho pequeno dos cromossomos e ao grande número.

Baseado na variabilidade do número de pares cromossomais dentro da espécie e na inviabilidade de suas sementes, espera-se uma baixa variabilidade genética dentro de indivíduos das populações de *Arundo donax* L. (ELLSTRAND, ROOSE, 1987; SALTONSTALL, LAMBERT, MEYERSON, 2010).

3.1.2 Constituição Bioquímica

Através de análises químicas, percebeu-se a presença de uma grande quantidade de sílica em tecidos de *Arundo donax* L., devido ao grande número de células silicificadas nas folhas e colmos da espécie, principalmente nos feixes vasculares e no tecido epidermal (PERDUE, 1958).

A análise de celulose feita por Bhat e Virmani, 1951, encontrou um conteúdo de celulose de 58% em *Arundo donax*, contendo uma considerável proporção de hemicelulose e um baixo conteúdo de pentanas.

De acordo com o estudo publicado por Neto et al. (1997), através da extração dos polissacarídeos, é possível determinar a composição de lignina em *Arundo donax*, relacionando o conteúdo de lignina ao estádio de maturação da planta, e encontrando o percentual de 20-22% de liginina em tecidos mais antigos da planta, enquanto que tecidos mais jovens apresentam cerca de 16% de lignina. Nesse estudo, também comparou o conteúdo de lignina em diferentes partes da planta, onde as porções nodais apresentaram um conteúdo de lignina menor que o encontrado nos entrenós. Também foi determinado o conteúdo de holocelulose – termo utilizado para designar o conteúdo total de celulose e outros polissacarídeos após a remoção de lignina – através da extração com hidróxido de potássio (KOH) em nós e entrenós, onde a composição desses polissacarídeos variou de 59 a 65% nos entrenós, e 57-59% nas porções nodais da planta. Além disso, avaliou o conteúdo de proteínas na planta, que demonstrou-se ser um valor baixo e que não varia de acordo com o estágio de maturação da planta. Em seus tecidos, sua composição é de 21 a 30% de hemicelulose e cerca de 28 a 36% de celulose.

Neto et al. (1997) ainda determinou a composição de açúcares de *Arundo donax* L. através da hidrólise dos polissacarídeos seguida de cromatografia gasosa e espectrometria de massas utilizando tecidos de colmos e folhas da planta. Os principais açúcares presentes foram a glicose e xilose, com locais apresentando uma composição de xilose (24-27%) superior a de glicose (25-33%). Além desses açúcares, também apresenta em sua composição arabinose (4%) e galactose (1%), principalmente nas folhas.

Orlandi, Luca e Salanti (2013) apontam que em 100 g de *Arundo donax* há a concentração dos seguintes carboidratos: ramnose (0,15%), manose (0,35%), arabinose (2%), galactose (0,84%), xilose (33,88%) e glicose (62,13%).

Shatalov, Quilho e Pereira (2001) ainda complementam, demonstrando em seus estudos a presença de em média 22% de lignina, 42% de celulose e 27% de hemicelulose em *Arundo*, apresentando também o nível de monossacarídeos em nós e entrenós sendo, respectivamente em cada estrutura citada: arabinose – 3,22% e 35,91%, xilose – 0,16% e 1,17%, manose - 59,54% e 2,47%, galactose - 30,92 e 0,88% e glicose – 0,83% e 64,81%. Al-Snafi (2015) ainda menciona a presença de alguns elementos e suas concentrações, como: cálcio (0,30-0,67%), fósforo (0,08-0,15%), potássio (2,04-3,19%) e magnésio (0.20%-0.30%). Há autores que relatam ainda a presença de alcaloides, como triptamina, bufotenidina, gramina e arundamina, sendo rica em compostos ativos de triptamina (DUTTA e GOSHAL, 1967).

A partir da compilação de diversos estudos de diferentes autores, pode-se dizer que a caracterização de componentes químicos e bioquímicos do *Arundo donax L.* também está relacionada aos tratamentos e técnicas utilizadas para a extração e estudos desses componentes, podendo também estar relacionada com as condições de cultivo, ontogenia e genótipo.

3.2 Biomassa e Bioenergia

A biomassa é toda matéria orgânica derivada de seres vivos (animais, plantas e microrganismos) obtida através de produtos e subprodutos da agricultura e indústrias, capaz de constituir a matéria-prima para a produção de biocombustíveis (FERREIRA, 2015). A bioenergia, energia obtida através da biomassa, é um segmento importante dentre os tipos de energia renovável (LEMOS, 2012), com um imenso potencial, sendo o Brasil com grande quantidade de biomassa vegetal disponível para armazenamento e utilização para produção de biocombustíveis (FERREIRA, 2015). A biomassa também pode ser utilizada para a cogeração de energia, produzindo duas formas diferentes de energia ao mesmo tempo (CASTRO e DANTAS, 2008).

Os biocombustíveis são classificados em biocombustíveis de primeira geração (1G), segunda geração (2G) e terceira geração (3G). Os de primeira geração são produzidos a partir de biomassa que também são utilizadas para a alimentação humana, como é o caso do girassol, soja, cana-de-açúcar e milho (VILLANUEVA e LILIANA, 2016). Os de segunda geração são obtidos através da biomassa de espécies ricas em reservas amiláceas (como o *Arundo donax*

L.), podendo ser produzidos a partir de subprodutos agrícolas, por exemplo, como o bagaço de cana-de-açúcar. Os biocombustíveis de terceira geração são produzidos a partir de algas ou outros organismos autótrofos, e ainda carecem de pesquisa.

Apesar dos diversos usos das plantas de *Arundo donax* L. atribuídos ao redor do mundo, como na confecção de instrumentos musicais e varas de pescas, existe muito interesse na utilização da sua biomassa para a produção de biocombustíveis. Mesmo que a espécie *A. donax* seja uma gramínea perene, é capaz de crescer espontaneamente e apresenta um crescimento rápido e abundante, possuindo considerável tolerância à seca (AMADUCCI e PEREGO, 2015), crescendo em solos marginais (IMPAGLIAZZO et al., 2017) e sem competir com os sistemas de produção de alimentos (PROIETTI et al., 2017).

O que também a torna uma espécie agroenergética interessante, é o seu conteúdo de pentoses e hexoses, que são compostos essenciais para a produção de biocombustíveis de segunda geração e biogás (PROIETTI et al., 2017).

De forma geral, a espécie *Arundo donax* apresenta tais características de interesse para uma cultura agroenergética: alto potencial de produtividade, alto conteúdo de celulose, crescimento rápido, alta adaptabilidade a solos marginais e baixa necessidade de irrigação e nutrição (LEWANDOWSKI et al., 2003).

Nas tecnologias para a bioenergia, estuda-se a espécie como fonte para a produção de biogás (AMADUCCI e PEREGO, 2015; CORNO et al., 2015) e para a produção de biometano (RAGAGLINI, et al., 2014; CORNO et al., 2016), pois é capaz de ter um alto rendimento e baixo custo de produção devido a sua alta produção por hectare, baixa necessidade de insumos agrícolas e gasto energético (CORNO et al., 2016). Também há estudos sobre seu potencial em produção de bioetanol (JEON, XUN e ROGERS, 2010; PILU et al., 2012; SCORDIA, COSENTINO e JEFFRIES, 2013).

Quanto à produtividade da espécie, em 2013 foi capaz de produzir em média 74 t/ha de biomassa seca no outono, na Itália, de acordo com Borin et al. (2013), com o máximo de produtividade de 98 t/ha na cidade de Bolonha – Itália. Comparado à espécie *Miscanthus x giganteus*, *A. donax* apresenta produtividade de matéria seca de 37,7 t/ha, enquanto *M. giganteus* apresenta 28.7 t/ha, na região central da Itália (Angelini et al., 2009).

3.3 Biologia Molecular

Devido à sua reprodução agâmica através da propagação de fragmentos do rizoma e brotações laterais caulinares, é extremamente difícil o melhoramento genético dessa cultura através de cruzamentos genéticos. Seu número de cromossomos não é ainda bem estabelecido, variando de 40 a mais de 110 (BUCCI et al., 2013). Especula-se que a espécie *Arundo donax* L. seja um alopoliploide com um número de cromossomos maior que de muitas espécies similares, onde a dificuldade no estabelecimento de número de cromossomos dessa cultura se deve ao número grande de cromossomos, e ao seu pequeno tamanho (BUCCI et al., 2013). A instabilidade no número de cromossomos também reflete na gametogênese, pois acredita-se que a esterilidade de suas sementes seja devido à ploidia desigual em seus gametas, ocasionando inclusive a falta de pólen e murcha das anteras (HADDACHI et al., 2013). Essas alterações na gametogênese poderiam explicar a falta de reprodução sexuada na espécie (HARDION et al., 2015). Sua esterilidade implica a reprodução assexuada, reduzindo consideravelmente a sua variabilidade genética (MARIANI et al., 2010).

A diversidade genética é uma característica importante para potenciais cruzamentos e seleção de genes para traços desejáveis em culturas agroenergéticas, como a alta produtividade de biomassa, resistências a pestes e doenças, e a adaptabilidade a diversos ambientes, encontrados em *Arundo donax* L. (TOUCHELL et al., 2016). Porém, devido às características citadas anteriormente, ela possui uma baixa variabilidade genética (PERDUE, 1958; JOHNSON et al., 2006; MARIANI et al., 2010; TOUCHELL et al., 2016).

Por causa da complexidade do genoma, para avaliar sua variabilidade genética, é necessário primeiramente ter conhecimento das técnicas de extração de DNA que permitam a extração de grande quantidade e qualidade de DNA – para que a partir disso, possa-se realizar as etapas posteriores para a caracterização da diversidade genética.

Na literatura, há autores como Hardion et al. (2014) que utilizam o protocolo com o tampão de extração Brometo de Cetrimônio (CTAB) estabelecido por Doyle e Doyle (1987) na espécie *Arundo donax* L. para a extração de DNA total, às vezes com modificações específicas, como relata

Ahmad et al. (2008), que utiliza 10 µL de Proteinase K (20 mg mL^{-1}) a cada amostra após a adição do tampão CTAB. Outro protocolo também utilizado em *A. donax* L. é o estabelecido por Dellaporta et al. (1983), como demonstra os autores Bucci et al. (2013), Pilu et al. (2014) e Cantaluppi et al. (2016). Além de protocolos padrões já estabelecidos, também há autores que relatam a utilização de kits comerciais para a extração de DNA total, como Mariani et al. (2010) e Valli (2017).

3.3.1. Marcadores Moleculares

Para a caracterização de indivíduos de qualquer espécie vegetal, é necessário a utilização de marcadores moleculares – sequências específicas que se ligam a regiões do genoma, permitindo revelar o polimorfismo nas sequências de DNA dos indivíduos (AZEVEDO, 2010).

Os primeiros marcadores moleculares utilizados para o melhoramento genético de plantas foram as isoenzimas (TANKSLEY et al., 1981; AZOFEIFA-DELGADO, 2006). Hoje em dia, há diferentes tipos de marcadores moleculares, como os *Restriction fragment lenght polymorphism* (RFLP) capazes de hibridizar sequências específicas do DNA através de tratamento com enzimas de restrição (MOHAN et al.,1997); *Random amplified polymorphism DNA* (RAPD), que amplifica segmentos aleatórios do DNA através da reação em cadeia da polimerase (PCR); *Amplified Fragment Lenght Polymorphism* (AFLP), baseada na detecção de fragmentos genômicos digeridos por enzimas de restrição através da amplificação por PCR (VOS et al., 1995); e *Simple Sequence Repeats* (SSR), também chamados de microssatélites, capazes de identificar polimorfismos baseado no número de repetições únicas em nucleotídeos no genoma investigado (MOHAN et al., 1997).

Em *Arundo donax* L., há estudos que ainda utilizam isoenzimas e RAPD como marcadores moleculares para caracterizar a diversidade genética, como o por Khudamrongsawat et al. (2004) mostrando que o marcador RAPD revelou maiores variações genéticas entre os indivíduos avaliados quando comparado às isoenzimas, e dos 14 *primers* utilizados, três foram capazes de revelar *loci* polimórficos. Outro marcador utilizado na espécie é o AFLP, como demonstra Hardion et al. (2012), que utilizou seis pares de *primers* AFLP e foi capaz de identificar 1046 fragmentos de DNA onde 83% foram polimórficos. Também já

foram utilizados marcadores SSR, por Tarin et al. (2013), que descreveu 10 pares de *primers* SSR para a espécie, relatando ter conseguido detectar maior variabilidade genética que estudos já publicados com outros marcadores. Outro marcador utilizado são os *Inter Simple Sequence Repeats* (ISSR) (MARIANI et al., 2010; HARDION et al., 2012; TOUCHELL et al., 2016).

4 Materiais e Métodos

4.1 Coleta de Acessos

Foi realizada a definição de pontos de coleta para acessos de *Arundo donax* L. na cidade de Pelotas e outras cidades no estado do Rio Grande do Sul (RS), e contou-se um acesso coletado em Maceió/Alagoas (AL). As coletas foram realizadas por um período de 5 meses, de abril a setembro do ano de 2018. Nos pontos de coleta, foram retirados os rizomas para sua posterior propagação, como ilustrado na Figura 2, em três repetições de cada acesso.

Figura 2. Foto de rizoma de *Arundo donax* L. com brotação, pronto para plantio em recipiente.

4.2. Registro e manutenção dos acessos

Após a coleta de cada material, os rizomas foram plantados em recipientes de 5 litros para mudas, colocando-se substrato Turfa Fértil® até a metade da capacidade do recipiente. Imediatamente após o plantio nos recipientes, os acessos foram mantidos em telado coberto, localizado na Embrapa Clima Temperado, para o crescimento e desenvolvimento da planta.

Quando todos acessos obtiveram um crescimento foliar adequado, foi realizada a coleta de folhas jovens para posterior extração do material genético das plantas. Foram coletadas apenas as folhas mais jovens, ainda em processo

de formação, de cada acesso, fazendo-se a higienização das tesouras utilizadas para não ocorrer contaminação cruzada entre os materiais.

As folhas então foram acondicionadas em sacos plásticos e imediatamente levadas para o laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Clima Temperado, onde foi feita a maceração do material coletado em gral e pistilo, utilizando nitrogênio líquido. Posteriormente, o material já macerado foi armazenado em ultrafreezer (-80 ºC).

Antes do transplante dos acessos para o campo, foi realizada uma poda da parte aérea, no dia 09 de Novembro de 2018, para padronizar o tamanho dos acessos e facilitar o seu plantio.

4.3. Extração de DNA

Ao todo, durante o experimento, foram utilizados três métodos de extração de DNA total de plantas: O protocolo com CTAB, por Ferreira e Grattapaglia (1996), o protocolo de Dellaporta et al. (1983), e utilizou-se também o kit comercial Purelink Plant Total DNA Purification Kit, da Invitrogen®.

O primeiro protocolo de extração de DNA utilizado foi o método CTAB (Figura 3), desenvolvido por Ferreira e Grattapaglia (1996), a partir de modificações do protocolo padrão utilizando CTAB descrito por Doyle e Doyle (1987). Foram analisadas as 53 amostras de cada acesso, já previamente maceradas, às quais foi adicionado 700 µL de tampão de extração CTAB com 2 µL/ml de β-mercaptoetanol, passando depois por uma breve agitação em vórtex. As amostras foram incubadas em banho-maria pré-aquecido a 63±2 ºC por 45 min a 1h e após essa etapa, foi adicionado 600 µL de Clorofórmio Álcool Isoamílico (CIA). Depois, as amostras foram centrifugadas por 8 minutos a 9.000 rotações por minuto (rpm) para que ocorresse a separação das mesmas em fases – onde a fase aquosa superior foi retirada, e se a adicionou a ela 300 µL de isopropanol frio posteriormente a isso. Novamente, as amostras foram centrifugadas a 7.000 rpm por 5 min – dessa vez para que houvesse a formação de um *pellet*.

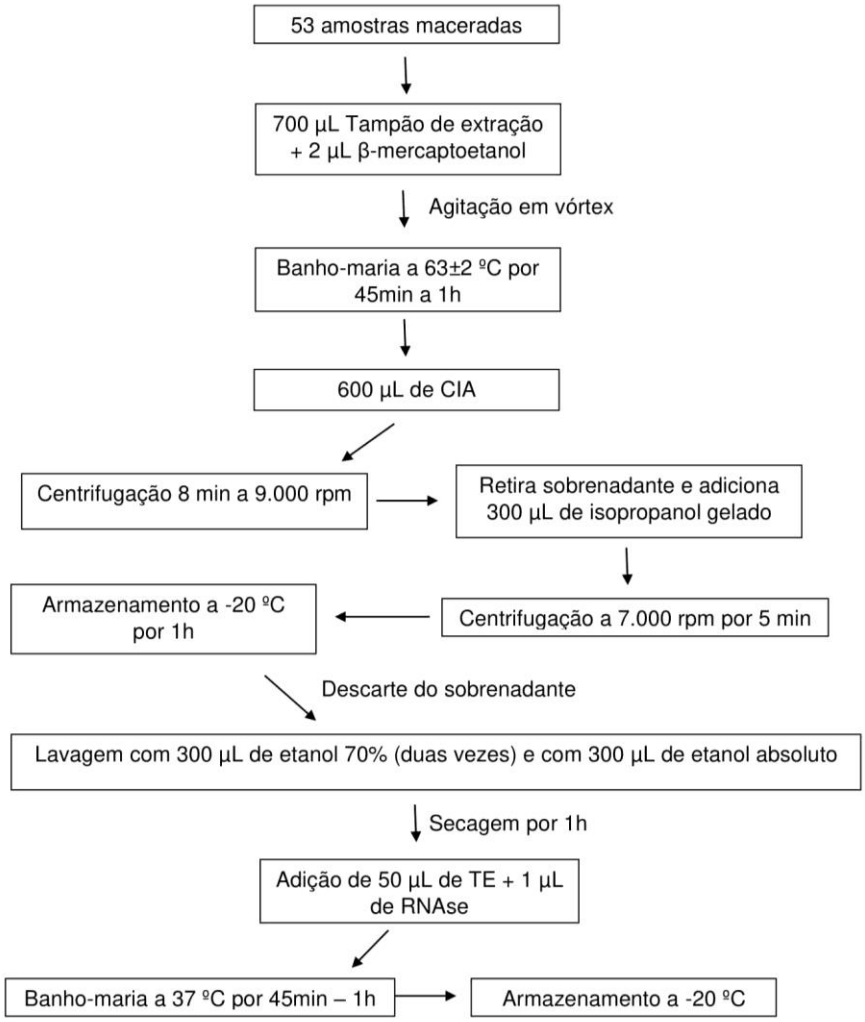

Figura 3. Fluxograma das etapas de extração de DNA pelo método CTAB adaptado.

Na espécie *Arundo donax* L., é necessário que as amostras sejam armazenadas por 1h ou mais em freezer (-20 ºC), para formar o *pellet*. Após formar os *pellets*, descartou-se o sobrenadante e foram realizadas lavagens com 300 µL de etanol 70% (duas vezes), repousando por 7 min a cada lavagem e descartando o etanol após o repouso, e 300 µL etanol absoluto, repousando por 3min e descartando o etanol após esse período de tempo. As amostras secaram em temperatura ambiente por 1h, adicionando ao final do processo 50 µL de Tris-EDTA (TE) e 1 µL de RNAse, incubando em banho-maria a 37 ºC por 45min-1h. No final do processo, as amostras foram armazenadas a -20ºC.

O mesmo protocolo foi realizado novamente em 5 amostras para determinar se a adição de Proteinase K tornaria a qualidade do DNA melhor, deixando-o mais íntegro e com menos contaminações. Para isso, a adição de 10 µL de Proteinase K (20mg mL^{-1}) em cada amostra poderia ser feita junto ao tampão de extração ou depois dele, como sugere Ahmad et al. (2008). A adição

de proteinase K também pode ser feita ao final da extração, após a adição de RNAse, adicionando 3 µL de proteinase K (1mg/mL) a cada amostra, incubando em banho-maria a 37ºC de 15 a 30min (POREBSKI et al., 1997).

Após cada protocolo de extração, foi feita a quantificação das amostras através da eletroforese em gel de agarose 1% a 150 V e 120 mA por 1h e 30min para verificar a integridade das amostras e estimar a quantidade de DNA obtida.

O segundo teste de extração de DNA foi feito utilizando o protocolo proposto por Arriel et al. (2002), através de modificações do protocolo de Dellaporta et al. (1983) (Figura 4). Das 53 amostras, foram selecionadas apenas 10 amostras para otimizar o processo, diminuindo o número amostral, baseando-se na qualidade das amostras do protocolo anterior. Dessa forma, as amostras selecionadas foram as dos acessos 3, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 e 16. Utilizou-se cerca de 80 mg de cada amostra, já maceradas, e adicionou-se 750 µL de tampão de extração (NaCl 500 mM; Tris HCl ph 8,0 100mM; EDTA 50mM; β-mercaptoetanol 0,2% e água mili-Q), pré-aquecido em banho-maria a aproximadamente 65 ºC. Então, adicionou-se 50 µL de Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) 20% em cada amostra, misturando por inversão e incubando a 65 ºC por 30 min. Após a incubação adicionou-se 250 µL de acetato de potássio 5 M, misturando-se por inversão novamente e incubando desta vez em gelo por 20 min, agitando a cada 5 min.

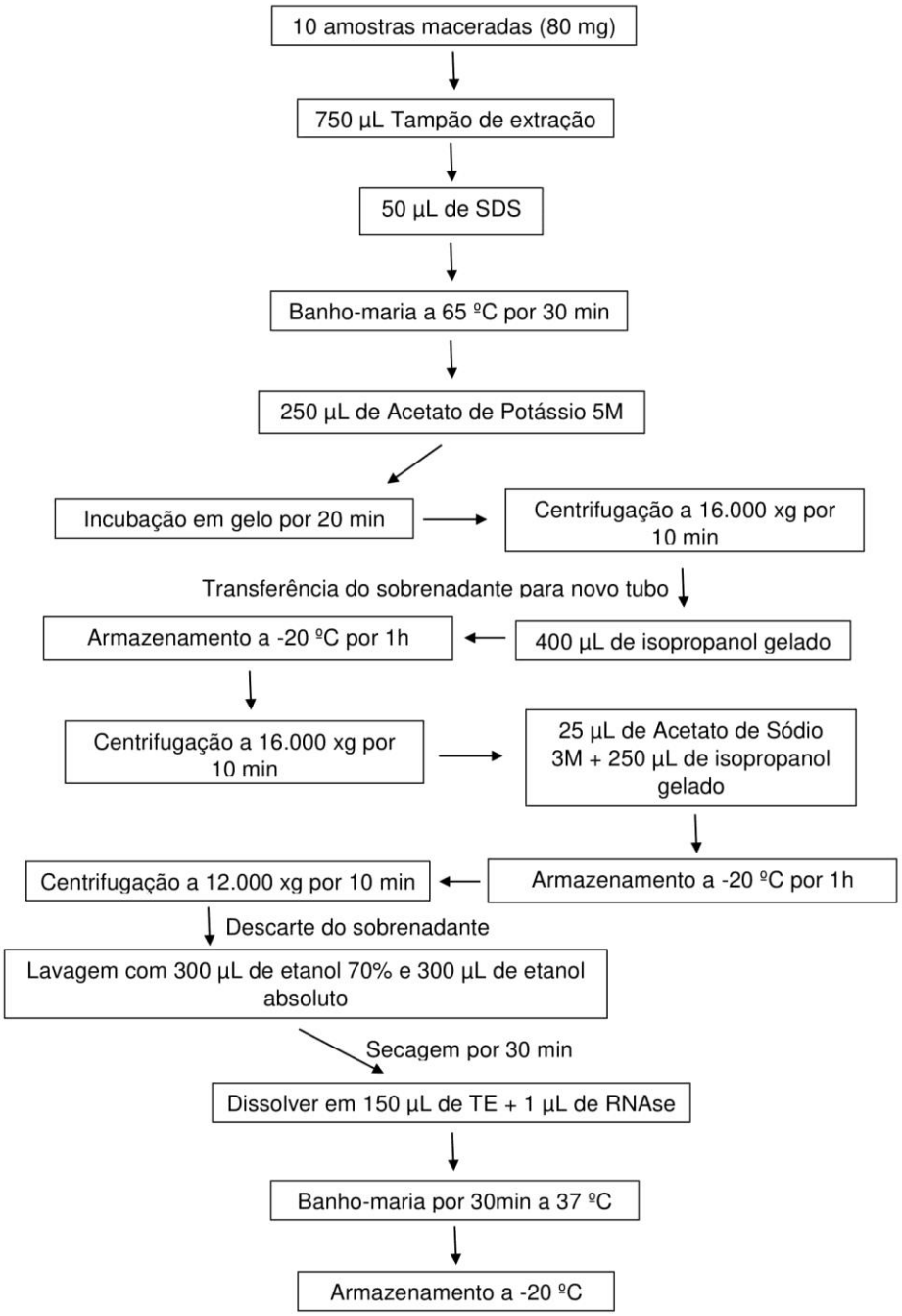

Figura 4. Fluxograma das etapas de extração de DNA do protocolo Dellaporta adaptado.

Posteriormente à incubação no gelo, centrifugou-se as amostras a 16.000 xg por 10 min, e transferiu-se a fase aquosa do sobrenadante para um novo tubo, adicionando 400 µL de isopropanol gelado a cada amostra. Depois dessa etapa, as amostras foram incubadas por pelo menos 1h a -20 ºC. Após esse intervalo de tempo, foi feita uma nova centrifugação por 10 min a 16.000 xg e descartou-se o sobrenadante desta vez. Foi feita a precipitação do DNA com 25 µL de acetato de sódio 3M a cada amostra e adiciona-se 250 µL de isopropanol gelado em cada amostra. Mais uma vez, as amostras são armazenadas a -20 ºC por no

mínimo 1h para que forme um sedimentado. Uma última centrifugação a 12.000 xg por 10 min foi feita depois dessa etapa, descartando o sobrenadante e lavando em 300 µL de etanol 70% (duas vezes) e 300 µL de etanol absoluto. O *pellet* formado foi seco em temperatura ambiente na câmara de fluxo laminar por 30 min, e dissolveu-se o *pellet* em 150 µL de tampão TE com 1 µL de RNAse, incubando em banho-maria a 37 ºC por 30 min. Depois disso, as amostras podem ser armazenadas a -20 ºC.

Por último, foi realizada a extração de DNA com o Kit comercial Purelink Plant Total DNA Purification Kit, da Invitrogen®. Assim como para o método de Dellaporta et al. (1983), utilizou-se apenas 10 amostras, sendo essas dos mesmos acessos do protocolo anterior. Seguiu-se as etapas que são descritas no manual do produto, e no fim, foi feita uma segunda eluição em um novo tubo estéril para garantir a extração de uma quantidade maior de DNA. Dessa forma, ao final da extração, totalizaram-se 20 amostras.

4.4 Quantificação do DNA

Após todas extrações de DNA, para ter maior precisão sobre a quantidade de DNA obtido, foi feita a leitura das mesmas 10 amostras de DNA de cada método de extração no aparelho de espectrofotometria Nano Vue® Plus (GE Healthcare Life Sciences), adicionando-se 2 µL de cada amostra para a sua quantificação, após a calibração do equipamento para cada protocolo de extração de DNA. Também foi feita a corrida de um gel de agarose 1% em eletroforese a 150 V e 120 mA por 1h e 30min das amostras coradas em GelRed. A leitura do gel foi realizada em fotodocumentador, contendo 10 amostras de cada protocolo de extração utilizado, avaliando-se visualmente a intensidade das bandas comparadas ao marcador λ DNA e enzima de restrição HindIII.

4.5 Teste de *primers* de cana-de-açúcar

Para verificar se era possível a amplificação de fragmentos de DNA de arundo utilizando *primers* de outra espécie, testou-se a amplificação com *primers* SSR de cana-de-açúcar, através de uma PCR utilizando GoTaq Green *master mix* como enzima termoestável para a polimerização das fitas de DNA. Foram testados 15 *primers* SSR, conforme apresentado na Tabela 1, onde 12 *primers* foram descritos no artigo de Singh et al. (2010) e 3 da publicação de Duarte Filho

et al. (2010). Na amplificação, são feitos 40 ciclos por 1 min a 94ºC para desnaturação do DNA, anelamento dos *primers* em 40 ciclos variando de 50 ºC a 60ºC por 1min, 72 ºC por 1min para extensão do DNA e extensão final a 72ºC por 5min. A eletroforese para visualização de bandas em gel de agarose 3% é feita em 180 V e 150 mA por 2h. A comparação das bandas é feita com a de marcador 1Kb Plus DNA Ladder, da Invitrogen®.

Tabela 1. Conjunto de *primers* de cana-de-açúcar testados na espécie *Arundo donax* L., com sua identificação, a sequência *forward* e *reverse* dos *primers*, e a temperatura de anelamento correspondente a cada um.

Pares de *Primers* SSR de cana-de-açúcar por SINGH et al. (2010)		
Identificação	Sequência dos *Primers*	Temperatura de anelamento (ºC)
SCC05*	F: CGC AAT CCA ATT CGT ACG TT	60
	R: CAT TGG TTG CAC CAC AGT TC	
SCC06*	F: TAT TCC ACC GGG AAC AAG AA	60
	R: GGG ATT GTA GCG ACG AGT TG	
SCC03*	F: CTCCGCATTAGCCATTTCC	60
	R: TGGTACTCGTCCATGTCGTC	
SCM4**	F: CATTGTTCTGTGCCTGCT	52
	R: CCGTTTCCCTTCCTTCCC	
SCM18**	F: CAT CAG TAT CAT TTC ATC TTG G	55
	R: CAG TCA ACG TCG GGT AGA	
SCM27**	F: TTC TCT GAC TTC CAA TCC AA	55
	R: ATC AAG CAC GCC CGC CTC	
SCM32**	F: GAT GAA GCC GAC ACC GAC	50
	R: AGT TGC CTG TTC CCA TTT	
SOMS148**	F: GAT GAC TCC TTG TGG TGG	52
	R: CTT GAC GAC CCT GCT GCT	
SOMS156**	F: ATC GTC TCT GGT TGT TGG T	52
	R: ATC CTC CAT TTC CAC CTC	
UGSM296**	F: ATT ATC TAC ATT CAG ACA CGT CAC	55
	R: ATC TTT GTT AGC AAT CCA TTA AG	
UGSM312**	F: AAC GTA TCT TTA TTT CCA TTC TTC	58
	R:CTT TCA GTT CAA CTT TGG ATA AAT	
UGSM575**	F: CTG TTT CCT TCC TTC TCG T	53
	R: CAA TCA TAG CCC AGA CAC C	
UGSM585**	F: GAA GAG GAGGAG AGG AGA AG	53
	R: TGG GAT GGT TGT TGA CTG	

UGSM504**	F: TAGAGGAAATAGCAGAACAGG	56
	R: AGACTGACACCTTTGAGATGA	
UGSM671**	F: TCCCTACTTCTATGAATATCCTTC	55
	R: TTGACAAATTGCTTGATGTAGT	

* *Primers* descritos por Duarte Filho (2010).
** *Primers* descritos por Singh et al. (2010).

4.6 Seleção e confecção de *primers* SSR

Além dessas análises, ainda foi realizado o pedido de síntese de 10 *primers* SSR específicos para a espécie *Arundo donax* L., de acordo com os conjuntos de *primers* descritos por Tarin et al. (2013) apresentados na Tabela 2 para fins de, posteriormente, caracterizar a diversidade genética dentro da coleção de acessos coletados neste estudo, que irão compor o banco ativo de germoplasma de *Arundo donax* L. da Embrapa Clima Temperado.

Tabela 2. *Primers* SSR de *Arundo donax* L., contendo o nome do locus, a sequência de primers (*Forward* e *Reverse*), o número de acesso da sequência no GenBank e temperatura ótima de anelamento.

Pares de *primers* microssatélite para Arundo donax L. de acordo com Tarin et al. (2013)

Nome do Locus	Sequência de primer	Nº de acesso no GenBank	Temperatura de anelamento (ºC)
Ad_G8	F: CCATGTAGAGACAAATCGGAAAG R: CAATAGTTCCAATATCAAACGTATCC	HQ224521	55
Ad_B7	F: CTATGCATAAGTTTAGATCTACAACTAG R: GGTTTTGGCGACAATAAGATAGTTC	HQ224523	55
Ad_A3	F: CACAGGCGCGTGATTGACC R: CAGATCCGACAGGACGAGATG	HQ224519	55
Ad_B1	F: CATGGATGCCAACTCCTTCAAC R: GGAAATACTTCATTCTAGTTAGAGATAGA	HQ224518	55
Ad_E10	F: GCTTCATATGTTTTGTCCCAACTC R : CAATCCTCGCCAGATCCAAGC	HQ224522	60
Ad_F8	F: TAGTGGTGACATGTGGCTTACC R: GGTTGGGCATGCACACGG	HQ224527	55
Ad4-13	F: TAGTAAGGCACCACGCAGCAC R: TTGGTCTAACTGAGAATGGGTTTC	HQ224526	55
Ad4-6	F: AGGAGTCCAATTTAACAGGAAAAGG R: GGGTTTCTCTCTAGTAGATTGATTAG	HQ224524	62
Ad_H1	F: GCTGGACATAGAAGCCGTTTTTG R: GCTTCCTTGGAAGTGAGGCAG	HQ224520	62
Ad5-4	F: CGCGTATGATCGTCCACCG R: ACGACCACACGCATTGCTCTG	HQ224525	55

Fonte: Adaptado de TARIN et al. (2013).

5 Resultados e Discussão

5.1. Coleta de acessos de *A. donax* L.

A partir da coleta de *Arundo donax* L. no Rio Grande do Sul, foram obtidos 52 acessos, e um acesso proveniente de Maceió/AL, conforme descrito na Tabela 3, com três repetições de cada material. As coletas foram realizadas por um período de 5 meses, de abril a setembro do ano de 2018, em diferente localizações e altitudes. Os pontos de coletas na cidade de Pelotas e no estado do Rio Grande do Sul estão ilustrados nas Figuras 3 e 4, respectivamente.

Tabela 3. Acessos de *Arundo donax* L. coletados no período de abril a setembro de 2018, apresentando o número dos acessos, a data da coleta, o local, as coordenadas geográficas da localização e a altitude em que se encontra.

Coleta de acessos de *Arundo donax* L.

Acesso	Data	Local	Latitude	Longitude	Altitude
1	19/04/2018	Embrapa Clima Temperado			
2	17/04/2018	BR 392 – Pelotas	31° 40' 36.1" S	52° 27' 16.5" W	
3	19/04/2018	Av. Presidente João Goulart - Pelotas	31° 44' 37.5" S	52° 21' 49.5" W	
4	13/09/2018	BR 392 – Pelotas	31° 45' 909" S	52° 22' 902" W	8m
5	19/04/2018	Av. Ferreira Viana - Pelotas	31° 45' 25.1" S	52° 18' 23.7" W	
6	10/05/2018	BR 293 – Candiota	31° 30' 57.1" S	53° 33' 07.6" W	255m
7	10/05/2018	BR 293 - Dom Pedrito	31° 00' 17.8" S	54° 36' 79.4" W	147m
8	11/05/2018	BR 290 – Alegrete	29° 48' 35.9" S	55° 47' 26.7" WO	85m
9	11/05/2018	BR 287 - Santa Maria	29° 42' 739" S	53° 49' 08.1" WO	70m
10	12/05/2018	BR 392 – Canguçu	31°13'7.29"S	52°49'23.75" W	319m
11	23/05/2018	Monte Bonito - Pelotas	31° 39' 116" S	52° 21' 691" W	43m
12	23/05/2018	R. Estevão Cândido Jorge dos Réis - Pelotas	31°45'51.29"S	52°21'22.75" W	16m
13	23/05/2018	Av. Ferreira Viana - Pelotas	31°45'26.66"S	52°18'36.57"W	11m
14	23/05/2018	R. Capitão Nelson Pereira - Pelotas	31°45'17.19"S	52°17'22.57"W	3m
15	29/05/2018	Av. Presidente João Goulart - Pelotas	31°44'7.98"S	52°22'8.76"W	10m
16	29/05/2018	Av. Ferreira Viana - Pelotas	31° 45' 167" S	52° 16' 988" W	6m

17	29/05/2018	Av. Ferreira Viana - Pelotas	31° 45' 167" S	52° 16' 988" W	6m
18	29/05/2018	Av. Domingos de Almeida	31°45'5.52"S	52°18'8.34"W	12m
19	29/05/2018	BR 392 – Pelotas	31°43'4.25"S	52°23'31.39"W	27m
20	06/06/2018	R. Cidade de Pinheiro Machado - Pelotas	31°46'18.09"S	52°13'41.27" W	10m
21	06/06/2018	BR 392 – Pelotas	31° 45' 808" S	52° 22' 764" WO	8m
22	21/08/2018	BR 471 - Santa Cruz do Sul	29°48'57.28"S	52°24'14.13" W	73m
23	21/08/2018	BR 287 - Santa Cruz do Sul	29°41'29.00"S	52°29'11.11" W	33m
24	21/08/2018	BR 287 - Candelária	29° 40' 599" S	52° 43' 660" WO	54 m
25	21/08/2018	BR 287 - Candelária	29° 40' 516" S	52° 49' 024" W	49m
26	21/08/2018	BR 287 - Candelária	29° 40' 061" S	52° 45' 819" WO	35m
27	21/08/2018	BR 287 - Candelária	29° 40' 216" S	52° 46' 102" WO	51m
28	21/08/2018	ERS 400 - Candelária	29° 36' 785" S	52° 48' 465" WO	48m
29	22/08/2018	BR 153 - Severiano de Almeida	28° 03' 975" S	52° 05' 654" WO	697m
30	22/08/2018	Barra do Rio Azul, RS	27° 24' 042" S	52° 25' 010" WO	541m
31	23/08/2018	BR 386 - Marques de Souza	29° 16' 821" S	52° 07' 929" WO	85m
32	23/08/2018	BR 386 – Estrela	29° 31' 765" S	51° 55' 660" WO	49m
33	23/08/2018	BR 116 - São Jerônimo	30° 25' 456" S	52° 13' 616" WO	53m
34	23/08/2018	Av. 25 de Julho - Pelotas	31° 43' 786" S	52° 20' 674" WO	4m
35	23/08/2018	R. Presbítero Cláudio Neutzling - Pelotas	31° 44' 387" S	52° 20' 747" WO	15m
36	23/08/2018	R. Presbítero Cláudio Neutzling - Pelotas	31° 44' 387" S	52° 20' 747" WO	15m

37	23/08/2018	R. Presbítero Cláudio Neutzling - Pelotas	31° 44' 387" S	52° 20' 747" WO	15m
38	23/08/2018	BR 392 – Pelotas	31° 40' 587" S	52° 27' 294" WO	113m
39	23/08/2018	BR 392 – Pelotas	31° 40' 127" S	52° 27' 599" WO	54m
40	25/08/2018	Brochier	29° 29' 18" S	51° 39' 16" W	301m
41	25/08/2018	Teutônia	29° 27' 08" S	51° 43' 20" W	
42	13/09/2018	BR 392 – Pelotas	31° 43' 20.56" S	52° 23' 14.07" W	1m
43	13/09/2018	BR 392 – Pelotas	31° 43' 20.56" S	52° 23' 14.07" W	1m
44	13/09/2018	BR 392 – Pelotas	31° 43' 20.56" S	52° 23' 14.07" W	1m
45	13/09/2018	BR 392 – Pelotas	31° 43' 20.56" S	52° 23' 14.07" W	1m
46	13/09/2018	R. Henrique Pancada - Rio Grande	32° 02' 611" S	52° 07' 955" WO	3m
47	13/09/2018	R. Jockey Club - Rio Grande	32° 02' 925" S	52° 08' 855" WO	3m
48	13/09/2018	R. Alberto Torres - Rio Grande	32° 02' 963" S	52° 09' 139" WO	3m
49	13/09/2018	R. Saturnino de Brito - Rio Grande	32° 03' 581" S	52° 08' 827" WO	3m
50	13/09/2018	BR 392 - Rio Grande	32° 05' 060" S	52° 12' 220" WO	13m
51	18/09/2018	Maceió			
52	18/09/2018	BR 471 - Santa Vitória do Palmar			
53	18/09/2018	Santa Vitória do Palmar			

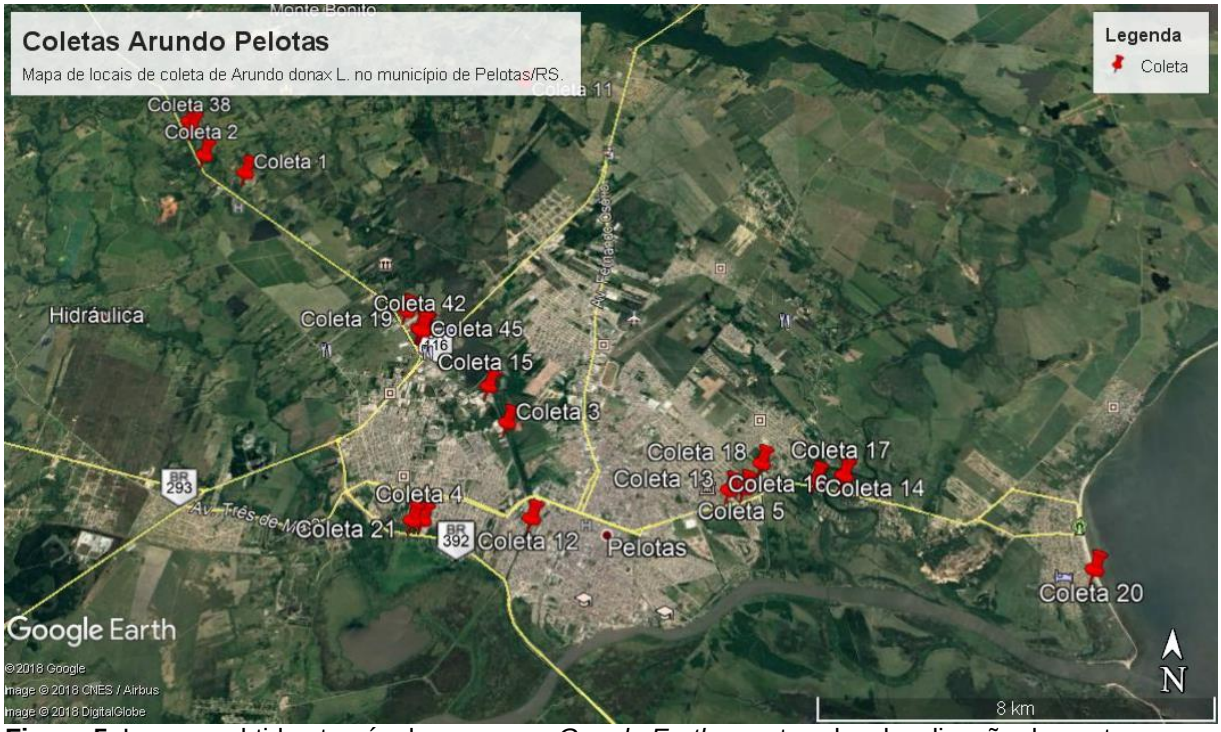

Figura 5. Imagem obtida através do programa *Google Earth*, mostrando a localização de pontos de coletas de *Arundo donax* L. na cidade de Pelotas/RS.

Figura 6. Imagem obtida através do programa *Google Earth*, mostrando a localização de pontos e coletas de *Arundo donax* L. dentro do estado do Rio Grande do Sul.

Ao total, foram 26 acessos coletados no município de Pelotas/RS, 26 acessos coletados em outras localidades no estado do Rio Grande do Sul, e um

acesso obtido de Maceió/AL. Todos os acessos foram plantados nos vasos de 5 litros e mantidos em telado coberto (Figura 7).

Figura 7. Acessos de *Arundo donax* L. desenvolvidos em ambiente telado coberto.

5.2. Estabelecimento de coleção de acessos

Os acessos permaneceram em ambiente telado coberto do início das coletas em abril, até o mês de novembro, quando foi realizada a poda dos acessos (Figura 8), em 09 de Novembro, para padronizar seu tamanho e facilitar seu plantio no campo. A partir do dia 19 de novembro, os acessos foram levados para o campo, onde o solo já estava preparado para receber as plantas, para aclimatização. Antes do plantio será realizada a caracterização fenotípica dos acessos, para compor o banco ativo de germoplasma da Embrapa Clima Temperado.

Figura 8. Acessos de *Arundo donax* L. após a poda das mudas para padronização da altura, em ambiente telado coberto.

5.3. Protocolos de extração de DNA de *A. donax* L.

O primeiro protocolo de extração de DNA testado foi o protocolo proposto por Ferreira e Grattapaglia (1996), que utilizam modificações do protocolo CTAB, descrito por Doyle e Doyle (1987). Para avaliar o resultado da extração de DNA, foi realizada a eletroforese das 53 amostras em gel de agarose 1%, visualizando a formação de bandas através do fotodocumentador. Os resultados mostravam a presença de DNA, porém, também apresentavam bandas fortes com menor peso molecular que o DNA – demonstrando a presença de contaminações nas amostras (Figura 9) e grande degradação das amostras devido à presença de arraste nas bandas. Para diminuir a contaminação, foi necessário a adaptação do protocolo com o uso de Proteinase K, como sugerido nos artigos de Ahmad et al. (2008) e Porebski et al. (1997).

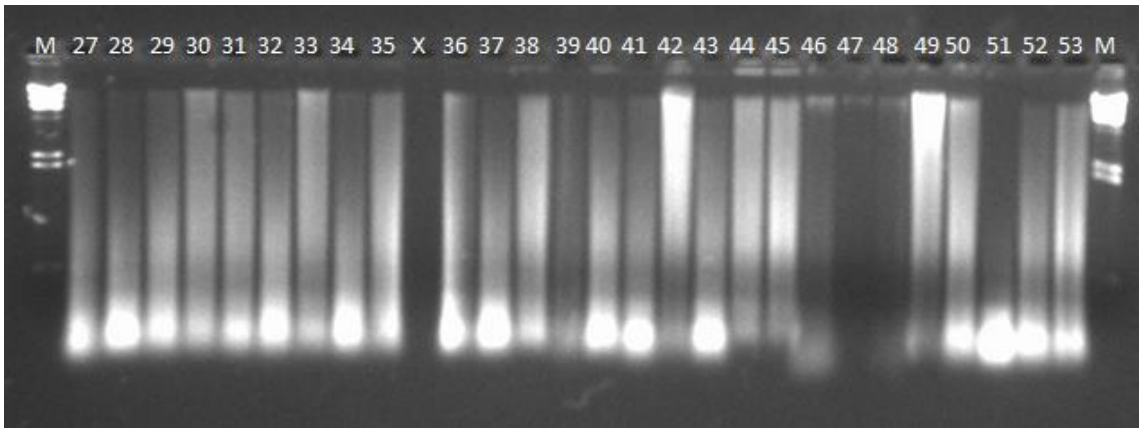

Figura 9. Gel de agarose demonstrando a presença de bandas de DNA, degradação das amostras e forte presença de contaminante.

A partir disso, foi realizado um teste com 5 amostras de arundo com a adaptação do protocolo adicionando 10 µL de proteinase K (20 mg mL^{-1}) junto ao tampão de extração. Apesar de não retirar completamente a contaminação, o protocolo mostrou-se efetivo para diminuir a concentração de contaminantes nas amostras. Após isso, adicionou-se 3 µL de proteinase K (1 mg/mL) às 53 amostras de DNA dos acessos, incubando em banho-maria a 37 ºC de 15 a 30 min, também sendo capaz de reduzir o teor de contaminantes nas amostras (Figura 10).

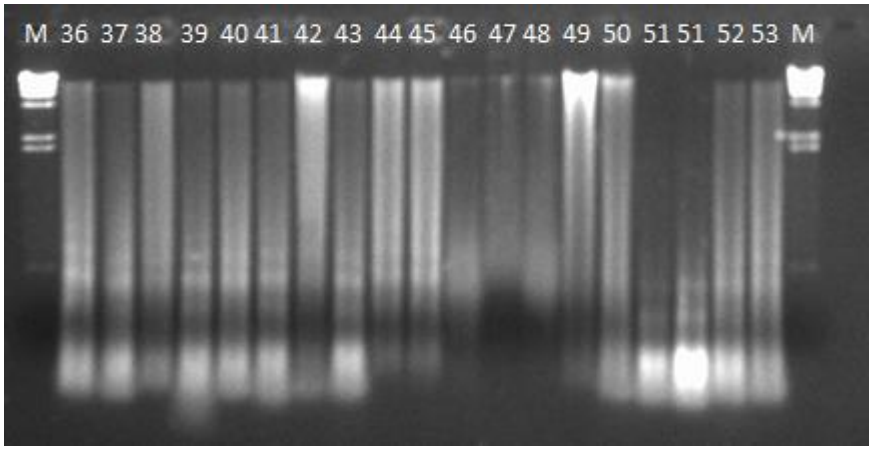

Figura 10. Gel de agarose 1% demonstrando a presença de bandas de DNA e a redução da concentração de contaminantes nas amostras.

O segundo método utilizado, visando-se obter amostras com DNA em maior quantidade, em melhor qualidade e sem contaminações, foi o proposto por Arriel et al. (2002) através de modificações do protocolo de Dellaporta et al. (1983). Utilizaram-se 10 amostras de arundo, dentre as com maior quantidade e qualidade de DNA através da visualização de bandas do gel de agarose do método CTAB. Foram as amostras: 3, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 e 16. Entretanto,

o método foi incapaz de extrair DNA das amostras de arundo, como demonstra a Figura 11.

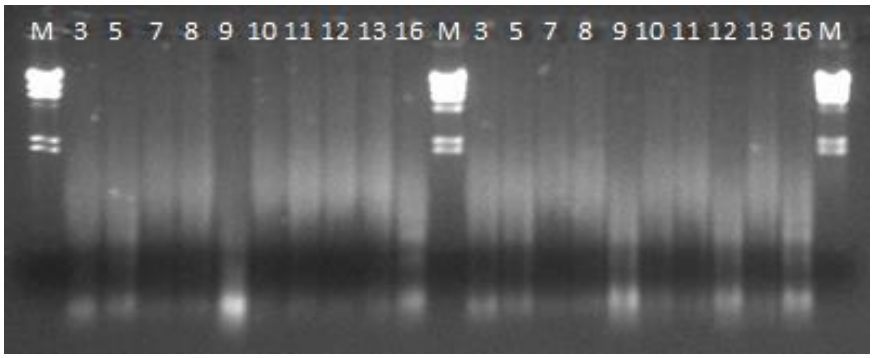

Figura 11. Gel de agarose para a quantificação das amostras após a extração pelo protocolo de Arriel et al. (2002).

O último método analisado foi a extração de DNA através de kit comercial Purelink Plant Total DNA Purification Kit, da Invitrogen®. Foram utilizadas as amostras 3, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 e 16, assim como no protocolo de Dellaporta, porém a etapa de eluição foi realizada duas vezes, dobrando o número de amostras: 3A, 5A, 7A, 8A, 9A, 10A, 11A, 12A, 13A, 16A, 3B, 5B, 7B, 8B, 9B, 10B, 11B, 12B, 13B e 16B. As amostras do grupo A deveria ter maior concentração de DNA, enquanto que as amostras do grupo B teriam menor concentração, pois estavam mais diluídas. Dentre os três métodos, a extração através do kit comercial mostrou-se a mais efetiva para eliminar a presença de contaminantes. Porém, a quantidade de DNA extraída foi pequena, sendo observado apenas duas bandas fracas no gel de agarose para quantificação das amostras (Figura 12).

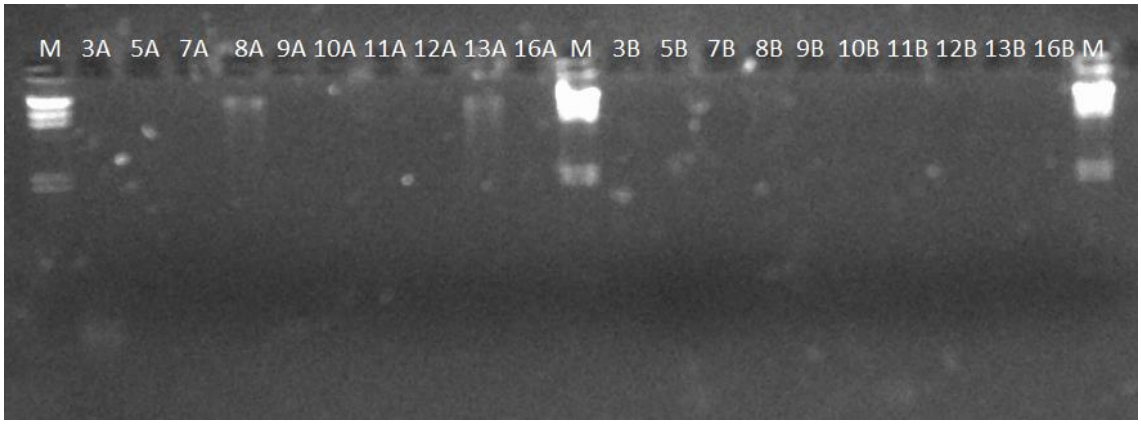

Figura 12. Gel de agarose para quantificação de amostras provenientes da extração de DNA utilizando o kit comercial da Invitrogen®. Apenas duas bandas são visíveis no gel.

A partir disso é possível identificar que para a extração de DNA de acessos de *A. donax* L., o método mais eficiente seria o proposto por Ferreira e

Grattapaglia (1996), com a utilização de proteinase K para diminuir a concentração de contaminantes. Porém, o método capaz de extrair DNA com a menor quantidade de contaminação foi o kit comercial da Invitrogen®. Para decidir o melhor protocolo de extração de DNA, é importante levar em conta para que o material extraído será utilizado – para a amplificação em PCR, por exemplo, é necessário uma concentração de DNA dentro de uma faixa específica para que a reação ocorra sem formação de estruturas secundárias no DNA; assim como há técnicas em que a pureza do DNA é um fator de extrema importância.

Para aprimorar a extração de DNA em *A. donax* L., seria interessante a identificação da molécula contaminante, assim como determinar como eliminar essa molécula de forma eficiente, sem causar maior degradação do DNA – como através de um pré-tratamento no material antes da maceração ou extração, ou na adição de etapas de extração de DNA visando a eliminação do contaminante.

5.4. Quantificação de amostras de DNA de *A. donax* L.

Através da quantificação por espectrofotometria no Nano Vue® Plus (GE Healthcare), fez-se a leitura da concentração das mesmas 10 amostras de cada método de extração três vezes. A partir dos dados obtidos (Tabela 4), se fez a média das três repetições para estimar qual protocolo foi capaz de extrair maior quantidade de DNA, e realizou-se o coeficiente de variação para atestar a precisão desses dados. Através dos resultados, foi possível identificar que o método Dellaporta extraiu maior quantidade de DNA, seguido do método de CTAB. O coeficiente de variação (CV) foi calculado apenas a partir das médias dos protocolos CTAB e Dellaporta, pois a quantidade de DNA extraída no kit comercial foi abaixo do limite de quantificação (LQ) do espectrofotometro. O CV das amostras de CTAB foi de 0,75 (75%), enquanto que do método de Dellaporta foi 0,38 (38%). Através disso, é possível perceber que as leituras do protocolo CTAB não foram tão homogêneas quanto as do protocolo Dellaporta. Porém, mesmo que os melhores resultados sejam do protocolo Dellaporta, é importante lembrar que não foi possível visualizar bandas no gel de agarose – logo, a leitura pode ter sido influenciada por outro tipo de molécula, não sendo tão confiável.

Tabela 4. Tabela com dados referentes às leituras da quantidade de DNA presente nas amostras extraídas a partir dos diferentes protocolos de extração de DNA, medido em ng/µL, apresentando o método de extração, o número da amostra, as referentes leituras e a média das mesmas.

Quantificação no espectrofotometro Nano Vue Plus				
Método de Extração	Nº da Amostra	Concentração 1 (ng/µL)	Concentração 2 (ng/µL)	Concentração 3 (ng/µL)
CTAB	3	152	87	122
CTAB	5	636	59	153
CTAB	7	169	175	26,5
CTAB	8	21,5	21,5	33,5
CTAB	9	48	46	64
CTAB	10	46	70	40
CTAB	11	21	21	88
CTAB	12	50	63	71
CTAB	13	109	132	80,5
CTAB	16	232	83	224
Dellaporta	3	235	262,5	266,5
Dellaporta	5	299	296	315,5
Dellaporta	7	LQ*	130	123
Dellaporta	8	246,5	266,5	254
Dellaporta	9	583	609	LQ*
Dellaporta	10	270,5	377	369,5
Dellaporta	11	178,5	283,5	97
Dellaporta	12	261,5	257	253,5
Dellaporta	13	348,5	370	LQ*
Dellaporta	16	404,5	422	429,5
Kit comercial	3A	LQ*	LQ*	LQ*
Kit comercial	5A	LQ*	LQ*	LQ*
Kit comercial	7A	LQ*	LQ*	LQ*
Kit comercial	8A	LQ*	LQ*	LQ*
Kit comercial	9A	LQ*	LQ*	LQ*
Kit comercial	10A	LQ*	LQ*	LQ*
Kit comercial	11A	LQ*	LQ*	LQ*
Kit comercial	12A	LQ*	LQ*	LQ*
Kit comercial	13A	LQ*	LQ*	LQ*
Kit comercial	16A	LQ*	LQ*	LQ*

*Valores abaixo do limite de quantificação (LQ)

Além da quantificação por espectrofotometria, também foi avaliada visualmente a quantidade de DNA obtida através da intensidade das bandas em gel de agarose. Para isso, foi feita a eletroforese de um gel de agarose 1% com 10 amostras de cada protocolo de extração de DNA. O resultado obtido, ilustrado na Figura 13, mostrou que dos três protocolos de extração de DNA, o protocolo CTAB apresentou o maior número de bandas visíveis, enquanto que o método de extração de DNA por kit comercial apresentou apenas uma banda visível. Não foi possível visualizar nenhuma banda nas amostras de DNA provenientes do protocolo Dellaporta, mostrando que não foi possível obter amostras de DNA viáveis através deste método.

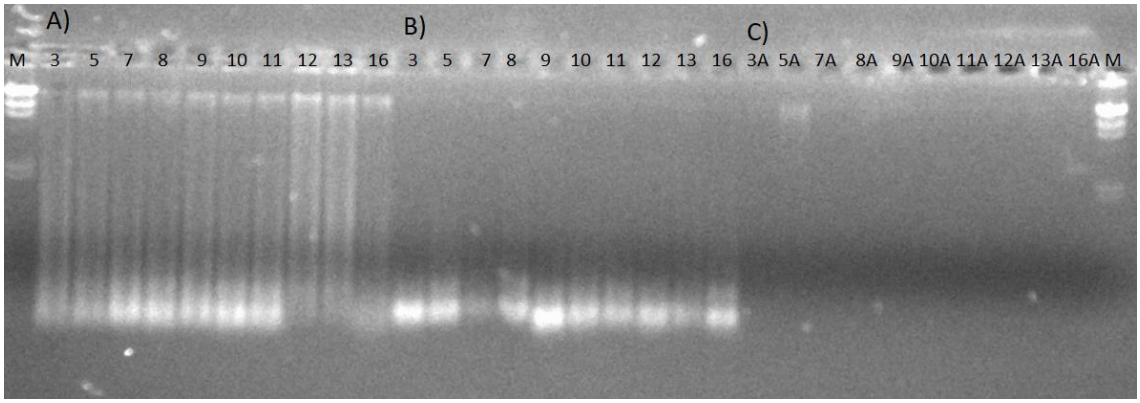

Figura 13. Quantificação em gel de agarose 1% das amostras de DNA provenientes dos três protocolos utilizados: A) CTAB; B) Dellaporta; C) Kit comercial.

5.5 Teste de *primers* de cana-de-açúcar

Apesar da presença de contaminantes, foi realizada uma PCR com primers SSR de cana-de-açúcar em amostras de arundo provenientes do protocolo CTAB para verificar se a quantidade de DNA obtida no método seria o suficiente para a amplificação das mesmas e se haveria alguma relação entre as espécies capaz de ser detectada através da técnica. Porém, como é possível verificar na Figura 14, não foi possível obter nenhum produto de amplificação na técnica de PCR, possivelmente por as espécies se relacionarem apenas no nível de família (Poaeceae).

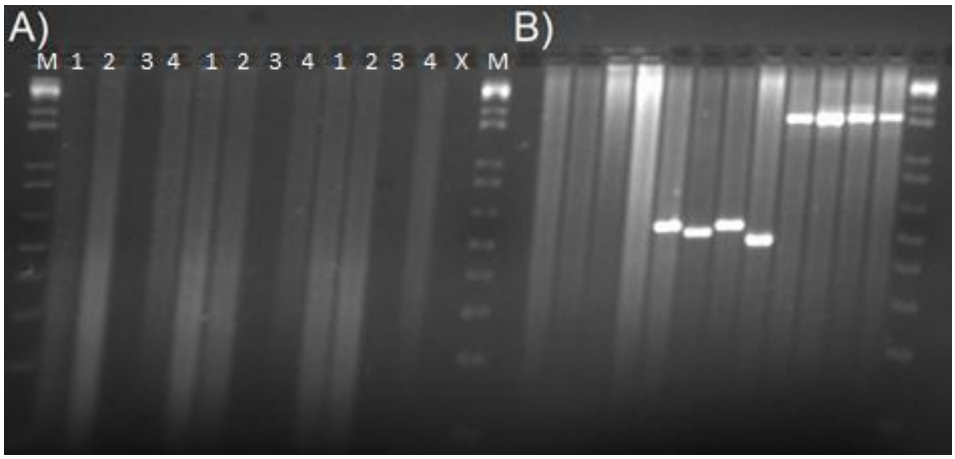

Figura 14. Imagem de gel de agarose para visualizar a presença de bandas após a amplificação. A) Amostras de *A. donax* L.; B) Amostras de cana-de-açúcar.

6 Considerações Finais

A coleta e estabelecimento de acessos mostraram-se dentro do esperado, sendo etapas concluídas com sucesso, obtendo um número significativo de acessos provenientes de diferentes locais, necessitando apenas do plantio para estabelecer o banco ativo de germoplasma de *Arundo donax* L. da Embrapa Clima Temperado e da caracterização fenotípica dos acessos. Ambos os procedimentos serão realizados posteriormente.

Quanto à seleção de um protocolo padrão para a extração de DNA de *Arundo donax* L., é possível observar que o protocolo CTAB sugerido por Ferreira e Grattapaglia (1996) mostrou-se o melhor para obter maior quantidade de DNA de tecidos de arundo. Apesar da adaptação utilizando Proteinase K para diminuir o teor de contaminantes, ainda é necessário fazer ajustes para aperfeiçoar a técnica de maneira a não ocorrer degradação das amostras durante o processo e não apresentar contaminações. Para isso, é importante determinar que tipo de contaminante está presente nas amostras, para poder estabelecer o melhor método de eliminação do mesmo: seja através de pré-tratamentos dos tecidos de *A. donax* L. antes da extração de DNA, ou então pela adição de etapas ao protocolo de extração de DNA capazes de eliminar o contaminante. Logo, ainda é necessário ajustar o protocolo. A eliminação de contaminantes também seria importante para não haver influências na quantificação por espectrofotometria.

Quanto à utilização de marcadores moleculares para caracterizar a diversidade genética da coleção de acessos de arundo, futuramente serão utilizados os *primers* apresentados no capítulo de materiais e métodos para tal propósito. É sugerido também a utilização de outros marcadores moleculares, como ISSR, para melhor caracterizar as diferenças genéticas dentro da espécie.

7 Referências Bibliográficas

AHMAD, R. et al. Molecular evidence for a single genetic clone of invasive Arundo donax in the United States. **Aquatic Botany**, v. 88, n. 2, p. 113-120, 2008.

AL-SNAFI, A. E. The constituents and biological effects of Arundo donax-A review. **International Journal of Phytopharmacy Research**, v. 6, n. 1, p. 34-40, 2015.

AMADUCCI, S.; PEREGO, A. Field evaluation of Arundo donax clones for bioenergy production. **Industrial Crops and Products**, v. 75, p. 122-128, 2015.

ANGELINI, L. G.; CECCARINI, L.; BONARI, E. Biomass yield and energy balance of giant reed (*Arundo donax* L.) cropped in central Italy as related to different management practices. **European journal of agronomy**, v. 22, n. 4, p. 375-389, 2005.

ANGELINI, L. G. et al. Comparison of Arundo donax L. and Miscanthus x giganteus in a long-term field experiment in Central Italy: Analysis of productive characteristics and energy balance. **Biomass and bioenergy,** v. 33, n. 4, p. 635-643, 2009.

ARRIEL, N. H. C. et al. Análise comparativa de quatro protocolos de extração de DNA genômico, em Gergelim. **Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibrosas**, v. 6, n. 2, 2002.

AZEVEDO, VCR. Manual de Curadores de Germoplasma-Vegetal: Caracterização Molecular. **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia-Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento (INFOTECA-E)**, 2010.

AZOFEIFA-DELGADO, A. Uso de marcadores moleculares en plantas; aplicaciones en frutales del trópico. **Agronomía mesoamericana**, v. 17, n. 2, 2006.

BARRERO, R. A. et al. Shoot transcriptome of the giant reed, Arundo donax. **Data in brief**, v. 3, p. 1-6, 2015.

BHAT, R. V.; VIRMANI, K. C. Indigenous cellulosice raw-matreial for the production of pulp, paper and board 1. Pulps for writing and printing papers from Arundo donax. **Indian Forester**, v. 77, p. 365-73, 1951.

BOLAND, J. M. The importance of layering in the rapid spread of Arundo donax (giant reed). **Madrono**, v. 53, n. 4, p. 303-312, 2006.

BORIN, M. et al. Biomass production and N balance of giant reed (Arundo donax L.) under high water and N input in Mediterranean environments. **European journal of agronomy**, v. 51, p. 117-119, 2013.

BUCCI, A. et al. Analysis of chromosome number and speculations on the origin of *Arundo donax L*. (Giant Reed). **Cytology and genetics**, v. 47, n. 4, p. 237-241, 2013.

CANTALUPPI, E. et al. Study on the inflorescences of *Arundo donax* L. clones sampled in Italy. **Brazilian Journal of Botany**, v. 39, n. 1, p. 275-285, 2016.

DE CASTRO, N. J.; DANTAS, G. A. **Bioenergia no Brasil e na Europa: uma análise comparativa**. 2008.

CORNO, L. et al. Giant cane (*Arundo donax* L.) for biogas production: The effect of two ensilage methods on biomass characteristics and biogas potential. **Biomass and Bioenergy**, v. 93, p. 131-136, 2016.

CORNO, L. et al. New energy crop giant cane (*Arundo donax* L.) can substitute traditional energy crops increasing biogas yield and reducing costs. **Bioresource technology**, v. 191, p. 197-204, 2015.

DELLAPORTA, S. L.; WOOD, J.; HICKS, J. B. A plant DNA minipreparation: version II. **Plant molecular biology reporter**, v. 1, n. 4, p. 19-21, 1983.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochem. Bull. 19: 11—15., and AHD BROWN. 1990. Chlo roplast DNA polymorphism and phylogeny in the B genome of Glycine subgenus Glycine (Le guminosae). **Amer. J. Bot**, v. 77, p. 772-782, 1987.

DUARTE FILHO, L. S. C. et al. Genetic similarity among genotypes of sugarcane estimated by SSR and coefficient of parentage. **Sugar Tech**, v. 12, n. 2, p. 145-149, 2010.

DUTTA, S. K.; GHOSAL, S. Indole-3-alkylamines of *Arundo donax* L. **CHEMISTRY & INDUSTRY**, n. 48, p. 2046-&, 1967.

ELLSTRAND, N. C.; ROOSE, M. L. Patterns of genotypic diversity in clonal plant species. **American Journal of Botany**, v. 74, n. 1, p. 123-131, 1987.

FERREIRA, A. L. D. **Culturas energéticas: produção de biomassa e bioenergia. 2015**. Dissertação de Mestrado.

FERREIRA, M.; GRATTAPAGLIA, D**. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Embrapa/Cenargen, 1996, Brasília/DF.

FU, Y. et al. Dissection of early transcriptional responses to water stress in *Arundo donax* L. by unigene-based RNA-seq. **Biotechnology for biofuels**, v. 9, n. 1, p. 54, 2016.

GHETTI, P.; RICCA, L.; ANGELINI, L. Thermal analysis of biomass and corresponding pyrolysis products. **Fuel**, v. 75, n. 5, p. 565-573, 1996.

HADDADCHI, A.; GROSS, C. L.; FATEMI, M. The expansion of sterile Arundo donax (Poaceae) in southeastern Australia is accompanied by genotypic variation. **Aquatic botany**, v. 104, p. 153-161, 2013.

HARDION, Laurent et al. Revised systematics of Mediterranean Arundo (Poaceae) based on AFLP fingerprints and morphology. **Taxon**, v. 61, n. 6, p. 1217-1226, 2012.

HARDION, L. et al. Impact of polyploidy on fertility variation of Mediterranean Arundo L.(Poaceae). **Comptes rendus biologies**, v. 338, n. 5, p. 298-306, 2015.

HARDION, L. et al. Origin of the invasive Arundo donax (Poaceae): a trans-Asian expedition in herbaria. **Annals of botany**, v. 114, n. 3, p. 455-462, 2014.

HERRERA, A. M.; DUDLEY, T. L. Reduction of riparian arthropod abundance and diversity as a consequence of giant reed (Arundo donax) invasion. **Biological Invasions**, v. 5, n. 3, p. 167-177, 2003.

IMPAGLIAZZO, A. et al. Crop growth analysis and yield of a lignocellulosic biomass crop (*Arundo donax* L.) in three marginal areas of Campania region. **Italian journal of agronomy**, v. 12, n. 1, 2017.

JEON, Y. J.; XUN, Z.; ROGERS, P. L. Comparative evaluations of cellulosic raw materials for second generation bioethanol production. **Letters in applied microbiology**, v. 51, n. 5, p. 518-524, 2010.

JOHNSON, M.; DUDLEY, T.; BURNS, C. Seed production in Arundo donax. **Cal-IPC News**, v. 14, p. 12-13, 2006.

KHUDAMRONGSAWAT, J.; TAYYAR, R.; HOLT, J. S. Genetic diversity of giant reed (Arundo donax) in the Santa Ana River, California. **Weed Science**, v. 52, n. 3, p. 395-405, 2004.

LEMONS E SILVA, C. F. et al. Potential of giant reed (*Arundo donax* L.) for second generation ethanol production. Electronic Journal of Biotechnology, v. 18, n. 1, p. 10-15, 2015.

LEMOS, E. GM et al. Bioenergia: desenvolvimento, pesquisa e inovação. **Coleção PROPe Digital (UNESP)**, 2012.

LEWANDOWSKI, I. et al. The development and current status of perennial rhizomatous grasses as energy crops in the US and Europe. **Biomass and bioenergy**, v. 25, n. 4, p. 335-361, 2003.

MARIANI, C. et al. Origin, diffusion and reproduction of the giant reed (*Arundo donax* L.): a promising weedy energy crop. **Annals of Applied Biology**, v. 157, n. 2, p. 191-202, 2010.

MOHAN, M. et al. Genome mapping, molecular markers and marker-assisted selection in crop plants. **Molecular breeding**, v. 3, n. 2, p. 87-103, 1997.

NETO, C. P. et al. Variations in chemical composition and structure of macromolecular components in different morphological regions and maturity stages of Arundo donax. **Industrial Crops and Products**, v. 6, n. 1, p. 51-58, 1997.

ORLANDI, M.; LUCA, Z.; SALANTI, A. Characterization of lignocellulosic materials during the biorefinery process of Arundo donax for fine chemicals production. **University of Milano-Bicocca, Department of Earth and Environmental Sciences,** 2013.

PERDUE, R. E. Arundo donax—source of musical reeds and industrial cellulose. **Economic Botany**, v. 12, n. 4, p. 368-404, 1958.

PILU, R. et al. Giant reed (*Arundo donax* L.): a weed plant or a promising energy crop?. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 38, p. 9163-9174, 2012.

PILU, R. et al. Genetic characterization of an Italian Giant Reed (*Arundo donax* L.) clones collection: exploiting clonal selection. **Euphytica**, v. 196, n. 2, p. 169-181, 2014.

POREBSKI, S.; BAILEY, L. G.; BAUM, B. R. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. **Plant molecular biology reporter**, v. 15, n. 1, p. 8-15, 1997.

PROIETTI, S. et al. Chemical composition and yield of rhizome biomass of *Arundo donax* L. grown for biorefinery in the Mediterranean environment. **Biomass and Bioenergy**, v. 107, p. 191-197, 2017.

ROMANO, E.; BRASILEIRO, A. C. M. Extração de DNA de tecidos vegetais. **Manual de transformação genética de plantas**, p. 163-175, 1998.

ROSSA, B. et al. *Arundo donax* L.(Poaceae)—a C3 species with unusually high photosynthetic capacity. **Botanica Acta**, v. 111, n. 3, p. 216-221, 1998.

SALTONSTALL, K.; LAMBERT, A.; MEYERSON, L. A. Genetics and reproduction of common (Phragmites australis) and giant reed (Arundo donax). **Invasive Plant Science and Management**, v. 3, n. 4, p. 495-505, 2010.

SCORDIA, D.; COSENTINO, S. L.; JEFFRIES, T. W. Enzymatic hydrolysis, simultaneous saccharification and ethanol fermentation of oxalic acid pretreated giant reed (*Arundo donax* L.). **Industrial crops and products**, v. 49, p. 392-399, 2013.

SHATALOV, A. A.; QUILHO, T.; PEREIRA, H.. *Arundo donax* L. reed: New perspectives for pulping and bleaching: I. Raw material characterization. **Tappi Journal**, v. 84, n. 1, 2001.

SINGH, R. K. et al. 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, 2010.

TANKSLEY, D.; MEDINA-FILHO, H.; RICK, C. M. The effect of isozyme selection on metric characters in an interspecific backcross of tomato—basis of an early screening procedure. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 60, n. 5, p. 291-296, 1981.

TARIN, D. et al. Microsatellites uncover multiple introductions of clonal giant reed (Arundo donax). **Invasive Plant Science and Management**, v. 6, n. 3, p. 328-338, 2013.

TOUCHELL, D. H. et al. Genetic Diversity, Cytogenetics, and Biomass Yields among Taxa of Giant Reeds (Arundo Species). **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 141, n. 3, p. 256-263, 2016.

VALLI, F. **Physical Mutagenesis in Giant Reed (*Arundo donax* L.) and Phenotypic and Genomic Characterization of Mutagenized Clones**. 2017. Tese de Doutorado. alma.

VILLANUEVA, L; LILIANA, G. ***Arundo donax* L. como gramínea perenne para la producción de biomasa en ambiente Mediterráneo**. 2016.

VOS, P. et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic acids research**, v. 23, n. 21, p. 4407-4414, 1995.

WAGNER, W. L. et al. **Manual of the Flowering Plants of Hawai'i**, Vols. 1 and 2. University of Hawai'i and Bishop Museum Press, 1999.

WATSON, L., MACFARLANE, T.D. e DALLWITZ, M.J. **The grass genera of the world: descriptions, illustrations, identification, and information retrieval; including synonyms, morphology, anatomy, physiology, phytochemistry, cytology, classification, pathogens, world and local distribution, and**

references. CAB international, 1992. Versão: 14 de outubro de 2018. Disponível em: <*https://www.delta-intkey.com/grass/www/arundo.htm*>

ZEVEN, A. C.; DE WET, J. M.J. **Dictionary of cultivated plants and their regions of diversity: excluding most ornamentals, forest trees and lower plants**. Pudoc, 1982.