

## CARACTERIZAÇÃO DA VARIABILIDADE GENÉTICA EM CANA-DE-AÇÚCAR (*Saccharum spp.*) ATRAVÉS DE MARCADORES MICROSSATÉLITES

**KNEIB, Raquel Bartz<sup>1</sup>; VILLELA, Juliana Castelo Branco<sup>2</sup>; KNEIB, Roberta Bartz<sup>3</sup>; PINHEIRO, Natércia Lobato<sup>4</sup>.**

<sup>1</sup>Estudante de agronomia, bolsista Embrapa Clima Temperado [raquelkneib@yahoo.com.br](mailto:raquelkneib@yahoo.com.br)

<sup>2</sup>Bióloga, Dsc em Melhoramento Genético, bolsista Embrapa Clima Temperado [icbrancov@gmail.com](mailto:icbrancov@gmail.com)

<sup>3</sup>Estudante do curso técnico em agropecuária, bolsista Embrapa Clima Temperado [robertakneib@yahoo.com.br](mailto:robertakneib@yahoo.com.br)

<sup>4</sup>Química, Analista Embrapa Clima Temperado [natercia@cpact.embrapa.br](mailto:natercia@cpact.embrapa.br)

**SILVA, Sérgio Delmar dos Anjos**<sup>5</sup>

<sup>5</sup>Eng. Agrônomo, Dsc. em Melhoramento Genético, Pesquisador - Embrapa Clima Temperado [sergio.anjos@cpact.embrapa.br](mailto:sergio.anjos@cpact.embrapa.br)

### 1 INTRODUÇÃO

A cultura de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) tem contribuído significativamente para a economia nacional, sendo matéria prima para a produção do açúcar, do álcool e também de outros produtos de relevante importância econômica. O Brasil permanece como maior produtor mundial a mais de 28 anos, em virtude do desenvolvimento de variedades mais produtivas e com caracteres agrônômicos favoráveis (FILHO, 2009).

Atualmente as variedades cultivadas no Brasil são o resultado de cruzamentos interespecíficos entre *Saccharum officinarum*, *S. barbieri*, *S. sinense* e as espécies selvagens *S. spontaneum* e *S. robustum*. A cana-de-açúcar apresenta um dos genomas mais complexos do reino vegetal, com um número diplóide de cromossomos que varia entre 70-120 (BARBOSA, 2008). Em vista da extensa coleção de recursos genéticos de cana e a importância desses para o sucesso de programas de melhoramento, é essencial determinar a variabilidade genética em cultivares de cana-de-açúcar (ALMEIDA, 2009). Um banco ativo de germoplasma com genótipos bem caracterizado permite planejar os cruzamentos, explorando de forma mais eficiente os recursos genéticos (FILHO, 2008).

Segundo ALMEIDA (2009) os marcadores de DNA apresentam a vantagem de representar todo o genoma, mantendo consistência nos resultados, evitando o problema da expressão do fenótipo. Neste sentido, este trabalho tem como objetivo estimar a variabilidade genética de genótipos de cana-de-açúcar utilizando marcadores de microssatélites.

### 2 METODOLOGIA

Foram analisados neste trabalho 25 genótipos de cana-de-açúcar provenientes do programa de melhoramento de cana da RIDESA/UFPR. O DNA foi extraído de folhas jovens de um único indivíduo por genótipo, segundo a metodologia descrita por Ferreira & Grattapaglia (1996). A quantificação e qualidade do DNA foram avaliadas por análise comparativa com os fragmentos produzidos por amostras de concentrações conhecidas em eletroforese em géis de agarose 1% (p/v) corados com Gel Red (Biotium).

Selecionou-se 20 *primers* considerados mais polimórficos, dentre os 31 *primers* sintetizados para o genoma da cana-de-açúcar, com base no trabalho de SINGH et. al (2010).

O SSR-PCR foi desenvolvido numa reação com *GoTaq Green Master Mix* (Promega) a partir do protocolo desenvolvido pelo fabricante. O programa de amplificação utilizado foi do tipo *touchdown*, que consistiu de 18 ciclos de 94 °C por 1 minuto, seguido de um decréscimo de 1 °C a cada 2 ciclos (64 °C a 55 °C) e 72 °C por 1 minuto e mais 30 ciclos a 94 °C por 1 minuto, 55 °C por 1 minuto e 72 °C também por 1 minuto. Os produtos da reação foram separados através da eletroforese em gel de agarose 2,5% em Tampão TBE 1X, corados com Gel Red (Biotium), fotografados sob luz UV e classificados independentemente conforme presença (1) e ausência (0) de bandas. O peso molecular de cada fragmento foi estimado com base no Marcador de DNA 1 kb (1kb Ladder Plus, Invitrogen). Os dados gerados a partir da análise dos indivíduos testados foram utilizados para o cálculo da similaridade genética entre os pares de indivíduos, com o auxílio do programa computacional NTSYS pc 2.10m (Rohlf, 2000), utilizando o coeficiente de Dice (Dice, 1945). Com base nas matrizes de similaridade geradas, foi construído um dendrograma por meio do método de agrupamento UPGMA. Para a verificação do ajuste entre a matriz de similaridade e o respectivo dendrograma, foi estimado o coeficiente de correlação cofenética ( $r$ ), conforme Sokal & Rohlf (1962).

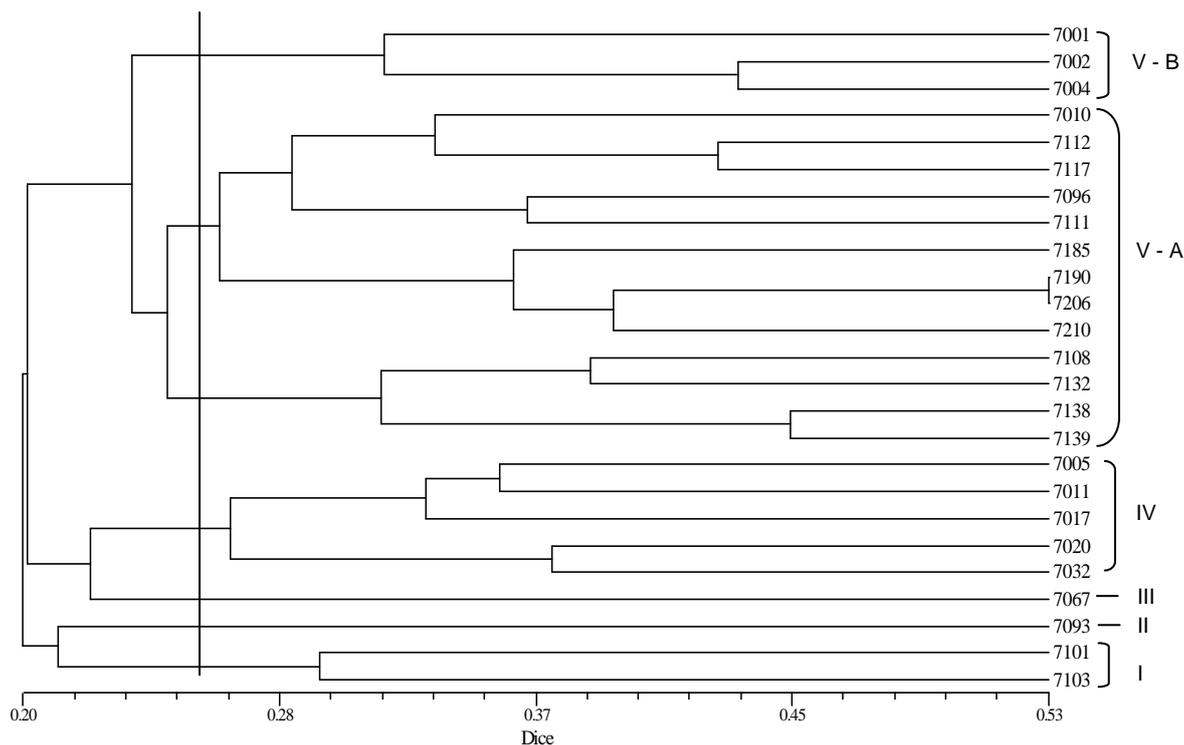
### 3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Na análise dos 25 genótipos foram gerados 248 marcadores com os 20 *primers* selecionados. O coeficiente médio de similaridade (0,23), foi utilizado como referência para a discussão dos agrupamentos formados (figura 1), o que possibilitou a separação dos genótipos em 5 grupos, onde o agrupamento I foi formado por duas variedades de ciclo médio. Os genótipos 7093 e 7067, ambos clones de ciclo precoce, agruparam-se isoladamente, formando os grupos II e III, respectivamente, apresentando a menor similaridade entre os genótipos estudados. No agrupamento IV foi possível observar a presença de uma variedade de ciclo precoce e clones de ciclo médio e precoce. A maioria dos acessos ficaram no agrupamento V, o qual apresentou dois subgrupos: subgrupo V-A que revelou como genótipos mais similares da análise os clones de ciclo médio 7190 e 7206, e subgrupo V-B que reuniu apenas variedades de ciclo precoce.

### 4 CONCLUSÃO

A caracterização através de marcadores moleculares tipo microssatélites sintetizados a partir do genoma da cana, apresenta alta eficiência na separação de grupos de genótipos.

A coleção de cana-de-açúcar apresenta alta variabilidade genética, importante para uso em programas de melhoramento.



**Figura 1.** Dendrograma de 25 genótipos de cana-de-açúcar obtidos a partir da análise molecular de microssatélites, utilizando o índice de similaridade de Dice (1945) e o método de agrupamento UPGMA. Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2010.

## 5 REFERÊNCIAS

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**. Australia, v.4, n.2, p.116-125, 2010.

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

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**, Lavras, v.33, n.5, p. 1510-1515, 2009.

DICE, L.R.. Measures of the amount of ecological association between species. **Ecology**, Washington, v.26, n.3, p.297-307, 1945.

SOKAL, R.R.; ROHLF, F.J.. The comparison of dendrograms by objective methods. **Taxon**, Berlin, v.11, n.1, p.30-40, 1962.

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, novembro 2008.

DUARTE FILHO, L.S.C.; SILVA, P.P.; SANTOS, J.M.; BARBOSA, G.V.S.; ALMEIDA, C.C.S.. Variabilidade genética em cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.), estimada por meio de marcadores moleculares microssatélites (SSR). In: **54º CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA**, Salvador, 16 a 19 de setembro de 2008. Variabilidade genética em cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.), estimada por meio de marcadores moleculares microssatélites (SSR). Salvador: SBG, 2008, p.191.

FILHO, J.A.D.; COSTA, M.G.S.; BASTOS, G.Q.B.; RESENDE, L.V.; MELO, J.O.T.; ANDRADE, J.S.C.O.; SILVA JÚNIOR, J.R. Avaliação agrônômica e divergência genética em famílias de cana-de-açúcar. In: **IX JORNADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO**, Recife, 19 a 23 de outubro de 2009. Avaliação agrônômica e divergência genética em famílias de cana-de-açúcar. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2009.

ROHLF, F.J. NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.1. Exeter Software, New York, 2000. 98p.