

VARIABILIDADE GENÓTIPO ENTRE GENÓTIPOS DE CANA-DE-AÇÚCAR POR MEIO DE MARCADORES MOLECULARES MICROSSATÉLITE

KNEIB, Raquel Bartz¹; GALLI, Vanessa²; KNEIB, Roberta¹; SILVA, Sérgio Delmar dos Anjos³

¹UFPEL, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel; ²UFRGS, Programa de pós-graduação em Biotecnologia, ³Pesquisador - Embrapa Clima Temperado. raquelkneib@yahoo.com.br.

1 INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.) é considerada uma das culturas de maior importância econômica no mundo. No Brasil, é a principal fonte da produção sucroalcooleira (CARDOSO-SILVA et al., 2010). Os programas de melhoramento genético clássicos desta cultura fundamentam-se no cruzamento de genitores, através de cruzamentos biparentais, especiais ou múltiplos, visando obter milhões de novos genótipos, que aproximadamente após 10 a 12 anos de seleção, geram poucas variedades. Isto por que a experimentação agrícola em cana é extremamente laboriosa, sendo necessárias avaliações de vários anos de colheita (cana-planta, soca e ressoca), devido ao fato de vários genes estarem envolvidos na determinação de um caráter de herança complexa que sofre grande influência do ambiente, dificultando o trabalho dos melhoristas na seleção dos melhores clones.

Diante das dificuldades encontradas no melhoramento clássico, a biotecnologia surgiu como um auxílio aos melhoristas, que serve como ferramenta para facilitar seleções de novas constituições genéticas (CARNEIRO, 2008). No entanto, o sucesso desses programas depende, primeiramente, da existência de variabilidade genética na população de base, pois permite a seleção de genótipos superiores, para serem multiplicados via reprodução vegetativa (enxertia ou estaca) para desenvolvimento de novas variedade (SILVA, 2007). Neste sentido, o presente trabalho tem como objetivo avaliar a diversidade genética de genótipos de cana-de-açúcar através de marcadores microssatélites.

2 METODOLOGIA (MATERIAL E MÉTODOS)

Neste trabalho o DNA das folhas jovens de 30 indivíduos foi extraído segundo a metodologia descrita por FERREIRA & GRATTAPAGLIA (1996). A quantificação e qualidade do DNA foram avaliadas por análise comparativa com marcado λ DNA/ Hind III em eletroforese em géis de agarose 1% (p/v) corados com Gel Red (Biotium).

Foram empregados no estudo os 10 *primers* selecionados como os mais polimórficos, dentre os 31 *primers* sintetizados para o genoma da cana-de-açúcar selecionados do artigo apresentado por 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 em eletroforese em

gel de agarose 3% em Tampão TBE 1X, e corados com Gel Red (Biotium) e fotografados sob luz UV.

Os produtos de reação de amplificação do SSR-PCR foram classificados independentemente conforme presença (1) e ausência (0) de bandas. O peso molecular de cada fragmento foi estimado com base no Marcador de DNA 1kb Ladder Plus (Invitrogen). Os dados gerados a partir da análise de todos os indivíduos testados foram utilizados na construção da matriz de dados binário que com o auxílio do programa NTSYS PC 2.10m (ROHLF, 2000). Utilizou-se o coeficiente de Dice (DICE, 1945) para o cálculo da similaridade genética, e 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 DISCUSSÃO

Foram gerados 109 marcadores a partir da avaliação dos produtos das reações de amplificação do DNA das 30 plantas com os 10 *primers* selecionados.

O coeficiente médio de similaridade, 0,33, foi utilizado como referência para a discussão dos agrupamentos formados, o que possibilitou a separação dos genótipos em 4 grupos. Onde o agrupamento I foi formado por apenas dois genótipos (1012 e 1017), sendo o primeiro de ciclo precoce e o segundo de ciclo médio. No agrupamento II foi possível observar a presença de clones de ciclo precoce e variedades de ciclo médio. Formado pela maioria dos acessos, o agrupamento III apresentou a formação de dois subgrupos: subgrupo III-A, em que foi possível observar a presença de clones de ciclo médio, e o subgrupo III-B que revelou como genótipos mais similares da análise o clone de ciclo médio 1027 e a variedade de ciclo precoce 1004. O genótipo 1001 apresentou a menor similaridade entre os genótipos estudados, importante para uso no programa de melhoramento genético.

Entretanto, para que esta informação a respeito da variabilidade em nível de DNA seja utilizada com eficiência, é necessário que também seja considerada a potencialidade agrônômica existente, para que possam ser realizados cruzamentos de interesse.

4 CONCLUSÃO

O uso de marcadores moleculares microssatélites foi eficiente para avaliar variabilidade genética desta população, que apresentou genótipo com alta dissimilaridade, a variedade precoce 1001, importante para uso em programas de melhoramento.

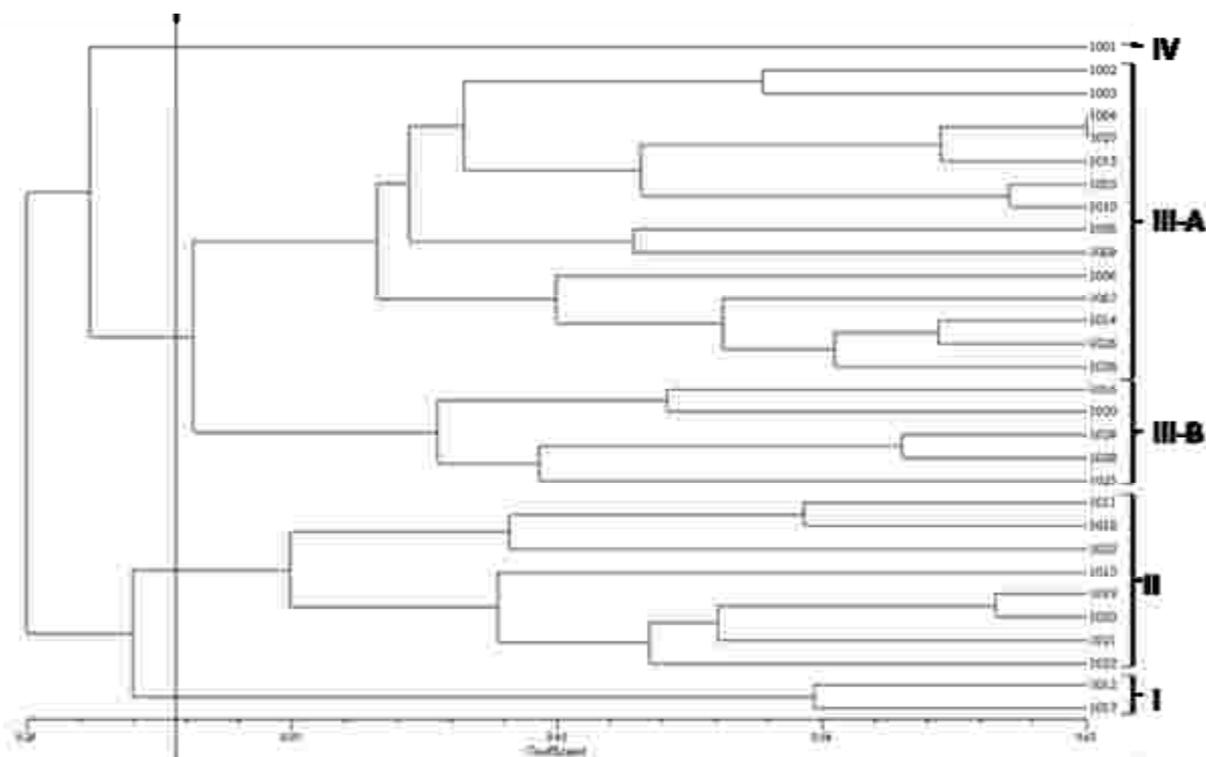


Figura 1. Dendrograma de 30 genótipos de cana-de-açúcar obtidos a partir da análise molecular de microssatélites, utilizando o índice de similaridade de Dice (1945) e o método de agrupamento UPGMA. Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2011.

5 REFERÊNCIAS

CARDOSO-SILVA, C.B.; COSTA, E.A.; MANCINI, M.C.; BALSALOBRE, T.W.A.; SOUZA, A.P.. Desenvolvimento e caracterização de marcadores microssatélite a partir de seqüências expressas em cana-de-açúcar. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA**, 56., Guarujá, 14 a 17 de setembro de 2010. Resumos do 56º Congresso Brasileiro de Genética. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2010. 21.

CARNEIRO, M.S., Melhoramento Molecular. **Revista opinioes**, Ribeirão Preto, SP, v. 21, p. 46, 2008.

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

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

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

SILVA, S.D.A.; LEMÕES, J.S.; ANTHONISEN, D.G. KNEIB, R.B.; MOREIRA, L.L. Variabilidade genética em população de tungue utilizando marcadores moleculares RAPD. In: **SIMPÓSIO ESTADUAL DE AGROENERGIA 1ª REUNIÃO TÉCNICA ANUAL DE PESQUISA DE AGROENERGIA**. Pelotas, 6 a 8 de novembro de 2007. Anais do Simpósio Estadual de Agroenergia 1ª Reunião Técnica Anual de Pesquisa de Agroenergia. 2007

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.

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