



# simpósio estadual de AGROENERGIA

## IV reunião técnica de agroenergia - RS

### VARIABILIDADE GENÉTICA ENTRE GENÓTIPOS CRIoulos DE CANA-DE- AÇÚCAR UTILIZANDO MICROSSATÉLITE

Raquel Bartz Kneib<sup>1</sup>; Vanessa Galli<sup>2</sup>; Sabrina Kneib<sup>3</sup>; Roberta Kneib<sup>1</sup>; Sérgio Delmar dos Anjos e Silva<sup>4</sup>

#### 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 (CARNEIRO, 2008).

Diante das dificuldades encontradas no melhoramento clássico, a biotecnologia surgiu como um auxílio aos melhoristas. 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 variedades (SILVA, 2007). Neste sentido, o presente trabalho tem como objetivo avaliar a diversidade genética de genótipos crioulos de cana-de-açúcar através de marcadores microsatélites.

#### MATERIAL E MÉTODOS

Neste trabalho o DNA das folhas jovens de 154 genótipos (Tabela 1) foi extraído segundo a metodologia descrita por FERREIRA & GRATTAPAGLIA (1996). A quantificação e qualidade do DNA foram avaliadas por análise comparativa com marcado  $\lambda$  DNA/ Hind III em eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) corados com Gel Red (Biotium). Foram empregados no estudo os 8 *primers* selecionados como os mais polimórficos dentre os 31 *primers* sintetizados para

<sup>1</sup>Estudante de agronomia - UFPel, bolsista Embrapa Clima Temperado. raquelkneib@yahoo.com.br

<sup>2</sup>Doutoranda no Programa de Pós-graduação em Biotecnologia – UFRGS. vane.galli@yahoo.com.br

<sup>3</sup>Bolsista Embrapa Clima Temperado. sabrinakneib@yahoo.com.br



# simpósio estadual de AGROENERGIA

## IV reunião técnica de agroenergia - RS

<sup>4</sup>Pesquisador - Embrapa Clima Temperado. sergio.anjos@cpact.embrapa.br  
o genoma da cana-de-açúcar selecionados do artigo apresentado por SINGH et al (2010). O microsatélite foi desenvolvido numa reação com *GoTaq Green Master Mix* (Promega) a partir do protocolo desenvolvido pelo fabricante. Os parâmetros de amplificação utilizados foram: 94°C por 5', seguido de 40 ciclos de 94°C por 15'', 52°C por 10'', 72°C por 15'', e uma extensão final de 72°C por 5'. Os produtos da reação foram separados em eletroforese em gel de agarose 3 % em Tampão TBE 1×, 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 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).

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram gerados 41 marcadores a partir da avaliação dos produtos das reações de amplificação do DNA dos 154 genótipos com os 8 *primers* selecionados. O coeficiente médio de similaridade (0,49) foi utilizado como referência para a discussão dos agrupamentos formados, o que possibilitou a separação dos genótipos em 7 grupos (Tabela 1). Os genótipos CPACT 117 e CPACT 115 constituíram os agrupamentos I e II, respectivamente, sendo os que apresentaram menor índice de similaridade entre os genótipos estudados, característica esta importante para uso no programa de melhoramento genético. O agrupamento III foi constituído de 70 genótipos, sendo possível observar a formação de 3 subgrupos, onde foi possível verificar a presença de genótipos com alta similaridade como o CPACT 098 e CPACT 099, CPACT 087 e CPACT 089, CPACT 086 e CPACT 092, e CPACT 82 e CPACT 112.

No agrupamento IV também houve a formação de três subgrupos entre os 57 genótipos do agrupamento. Os genótipos CPACT 040 e CPACT 038, e CPACT 036 e CPACT 018 formaram os agrupamentos V e VI, respectivamente. Já o agrupamento VII foi constituído por 21 genótipos.



# simpósio estadual de AGROENERGIA

IV reunião técnica de agroenergia - RS

**Tabela 1.** Grupos obtidos a partir da análise molecular de microssatélites dos 154 genótipos crioulos de cana-de-açúcar. Embrapa Clima Temperado, 2012, Pelotas, RS.

Grupo	Genótipo	Grupo	Genótipo	Grupo	Genótipo	Grupo	Genótipo
<i>I</i>	CPACT117	<i>III</i>	CPACT094	<i>IV</i>	CPACT166	<i>IV</i>	CPACT134
<i>II</i>	CPACT115		CPACT093		CPACT165		CPACT132
<i>III</i>	CPACT046		CPACT092		CPACT159		CPACT1525
	CPACT072		CPACT086		CPACT153		CPACT126
	CPACT066		CPACT089		CPACT156		CPACT124
	CPACT073		CPACT087		CPACT160		CPACT035
	CPACT059		CPACT081		CPACT152		CPACT034
	CPACT049		CPACT101		CPACT161		CPACT019
	CPACT064		CPACT099		CPACT154		CPACT016
	CPACT061		CPACT098		CPACT163		CPACT009
	CPACT057		CPACT102		CPACT170		CPACT003
	CPACT069		CPACT090		CPACT158		CPACT002
	CPACT065		CPACT110		CPACT172	<i>V</i>	CPACT040
	CAPAT056		CPACT111		CPACT157		CPACT038
	CPACT052		CPACT084		CPACT151	<i>VI</i>	CPACT036
	CPACT055		CPACT109		CPACT141		CPACT018
	CPACT053		CPACT108		CPACT133	<i>VII</i>	CPACT027
	CPACT051		CPACT085		CPACT037		CPACT028
	CPACT050		CPACT083		CPACT131		CPACT014
	CPACT070		CPACT112		CPACT130		CPACT017
	CPACT074		CPACT082		CPACT121		CPACT029
	CPACT071		CPACT077		CPACT120		CPACT026
	CPACT068		CPACT076		CPACT122		CPACT012
	CPACT048		CPACT107		CPACT119		CPACT008
	CPACT045		CPACT105		CPACT143		CPACT007
	CPACT062		CPACT113		CPACT147		CPACT006
	CPACT054		CPACT039		CPACT146		CPACT005
	CPACT044		CPACT033		CPACT144		CPACT023
	CPACT043		CPACT031		CPACT129		CPACT024
	CPACT060		CPACT032		CPACT148		CPACT020
	CPACT042		CPACT030		CPACT145		CPACT021
	CPACT041		CPACT103		CPACT142		CPACT025
	CPACT055		CPACT013		CPACT149		CPACT011
	CPACT075	<i>IV</i>	CPACT171		CPACT140		CPACT010
	CPACT091		CPACT169		CPACT150		CPACT015
	CPACT088		CPACT167		CPACT138		CPACT004
	CPACT079		CPACT164		CPACT136		CPACT001
	CPACT078		CPACT162		CPACT137		
	CPACT100		CPACT168		CPACT139		



# simpósio estadual de **AGROENERGIA**

## IV reunião técnica de agroenergia - RS

### CONCLUSÃO

Há variabilidade genética na coleção de genótipos Crioulos de cana-de-açúcar da Embrapa Clima Temperado, a qual é muito importante para uso no melhoramento, uma vez que estes genótipos são cultivados no Rio Grande do Sul e Santa Catarina a muitos anos, apresentando adaptação a este ambiente.

### 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 sequências 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.

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.

CARNEIRO, M.S. Melhoramento Molecular. **Revista Opiniões**, Ribeirão Preto, v.017, p.17, 2008.



# simpósio estadual de AGROENERGIA

IV reunião técnica de agroenergia - RS

**Figura 1.** Dendrograma de 154 genótipos crioulos 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. Fonte: Raquel Kneib, 2012.