



simpósio estadual de AGROENERGIA

V reunião técnica de agroenergia - RS

VARIABILIDADE GENÉTICA DE GENÓTIPOS DE CANA-DE-AÇÚCAR ATRAVÉS DE MARCADORES MICROSSATÉLITES.

Miriam Valli Büttow¹, Caren Regina Cavichioli Lamb², Fernando Fracaro³, Daiane Silva Lattuada⁴, Sergio Delmar dos Anjos e Silva⁵.

INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) é uma importante fonte de alimento e bioenergia, e um componente significativo da economia de muitos países tropicais e subtropicais (SMIULLAH et al., 2013), incluindo o Brasil. As cultivares modernas são altamente poliploides e aneuploides, com cerca de 120 cromossomos, derivadas principalmente de hibridizações interespecíficas entre *S. officinarum* e *S. spontaneum* L. A origem recente de cultivares derivadas de um germoplasma restrito pode resultar em perda de variabilidade genética (SANTOS et al., 2012).

O objetivo deste trabalho foi a caracterização molecular de 55 genótipos de cana-de-açúcar desenvolvidos pela RIDESA - Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroenergético e desenvolvidos em cooperação com a Embrapa Clima Temperado, Pelotas/RS.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal: os genótipos utilizados neste experimento são cultivados no Centro de Pesquisa Celeste Gobbato, Fepagro Serra do Nordeste em Caxias do Sul/RS. O DNA foi extraído de folhas jovens de 55 genótipos de cana-de-açúcar (KLEINHOFES et al., 1993) e as amostras foram ajustadas para uma concentração de $10 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$. Um conjunto de 30 primers de microssatélites previamente descritos (SINGH et al., 2010) foram testados e, destes, 16 apresentaram padrão polimórfico e foram analisados (SCM 016, SCM 018, SCM 021, SCM 027, SCM 032, SOMS 120, SOMS 143, SOMS 148, SOMS 154, SOMS 156, UGSM 193, UGSM 296, UGSM 312, UGSM 565, UGSM 574, UGSM 585). As reações de PCR foram realizadas conforme Singh et al. (2010). Os produtos de PCR foram visualizados através do sistema de fotodocumentação L-Pix (Loccus Biotecnologia) em gel de agarose 2% corado com GelRed (Biotium).

¹ Dra. em Genética e Biologia Molecular / Fepagro Serra do Nordeste. miriam-buttow@fepagro.rs.gov.br.

² Dra. em Fitotecnia / Fepagro Serra do Nordeste. caren-lamb@fepagro.rs.gov.br.

³ Dr. em Ecologia Recursos Naturais / Fepagro Serra do Nordeste. ffracaro@yahoo.com.br.

⁴ Dra. em Fitotecnia / Fepagro Serra do Nordeste. daiane-lattuada@fepagro.rs.gov.br.

⁵ Dr. em Fitotecnia / Embrapa Clima Temperado. sergio.anjos@embrapa.br.





simpósio estadual de AGROENERGIA

V reunião técnica de agroenergia - RS

Análise estatística: os produtos de PCR foram designados como “1” para presença e “0” para ausência de bandas. Somente bandas que apresentaram constância e nitidez foram analisadas e foi construída uma matriz binária com base nos dados obtidos. Foi calculado o número de alelos por loco (N_i) e o número total de alelos (N_A) para cada marcador. A heterozigosidade esperada (HZ) de cada alelo identificado foi calculada com a seguinte fórmula: $HZ_i = 1 - (P_{ip}^2 + P_{ia}^2)$, onde P_{ip} e P_{ia} são as frequências de presença e ausência de cada alelo. Em cana-de-açúcar, os marcadores moleculares do tipo microssatélites frequentemente identificam muitos alelos, devido à poliploidia. Portanto, foi utilizada a média da HZ de todos os alelos produzidos por um marcador como indicador da heterozigosidade média (ISOBE et al., 2013). A capacidade dos primers de diferenciar entre amostras foi acessada através do cálculo do poder de resolução: $R_p = \sum I_b$, onde $I_b = 1 - (2 \times |0,5 - p|)$ e onde p é a proporção dos genótipos contendo a banda (DEBNATH et al., 2008). A similaridade entre os indivíduos foi estimada segundo o coeficiente de Jaccard através da fórmula $S_{ij} = a/(a+b+c)$. Com base nos coeficientes de similaridade, foi construído um dendrograma, adotando como critério de agrupamento o método UPGMA (*unweighted pair-group method of arithmetic averages*) (DIAS, 1998), com o auxílio do programa NTSYSpc versão 2.01 (ROHLF, 2000).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A cana-de-açúcar é uma espécie poliploide com número de cromossomos variável entre indivíduos, sendo difícil estabelecer um número máximo de alelos que podem ser visualizados em cada loco. Neste trabalho, os 16 marcadores utilizados produziram 74 alelos polimórficos em 55 genótipos avaliados, com uma média de cinco alelos por marcador. O número de alelos de um genótipo variou de dois a nove, no marcador SOMS 156 e de três a seis no marcador SCM 32. A heterozigosidade esperada (HZ) para cada marcador variou de 0,10 a 0,45, com um valor médio de 0,33, enquanto que o poder de resolução R_p variou de 0,22 a 7,02. Marcadores com maiores valores de R_p normalmente são capazes de distinguir mais genótipos e apresentam bandas mais polimórficas (DEBNATH et al., 2008)

A matriz de similaridade mostrou três pares de genótipos com mais de 80% de similaridade genética: RB016910 X RB015895 (89%), RB005017 X RB005014 (85%) e RB975935 X RB867515 (83%). Por outro lado, as similaridades mais baixas entre pares de genótipos ficaram em torno de 30%: RB016910 X RB966923 (29%), RB996519 X RB996901 (30%) e RB016910 X



simpósio estadual de AGROENERGIA

V reunião técnica de agroenergia - RS

RB975042 (31%). A similaridade média entre os genótipos analisados foi de 56% (dados não apresentados).

Foi realizada análise de agrupamento baseada em 74 alelos informativos para fazer uma comparação entre os genótipos. O dendrograma, com um coeficiente de correlação cofenético de 0,84, mostrou diferenciação entre os genótipos, porém não houve a formação clara de subgrupos (Figura 1), sendo este, um indicativo de variabilidade genética (SANTOS et al., 2012).

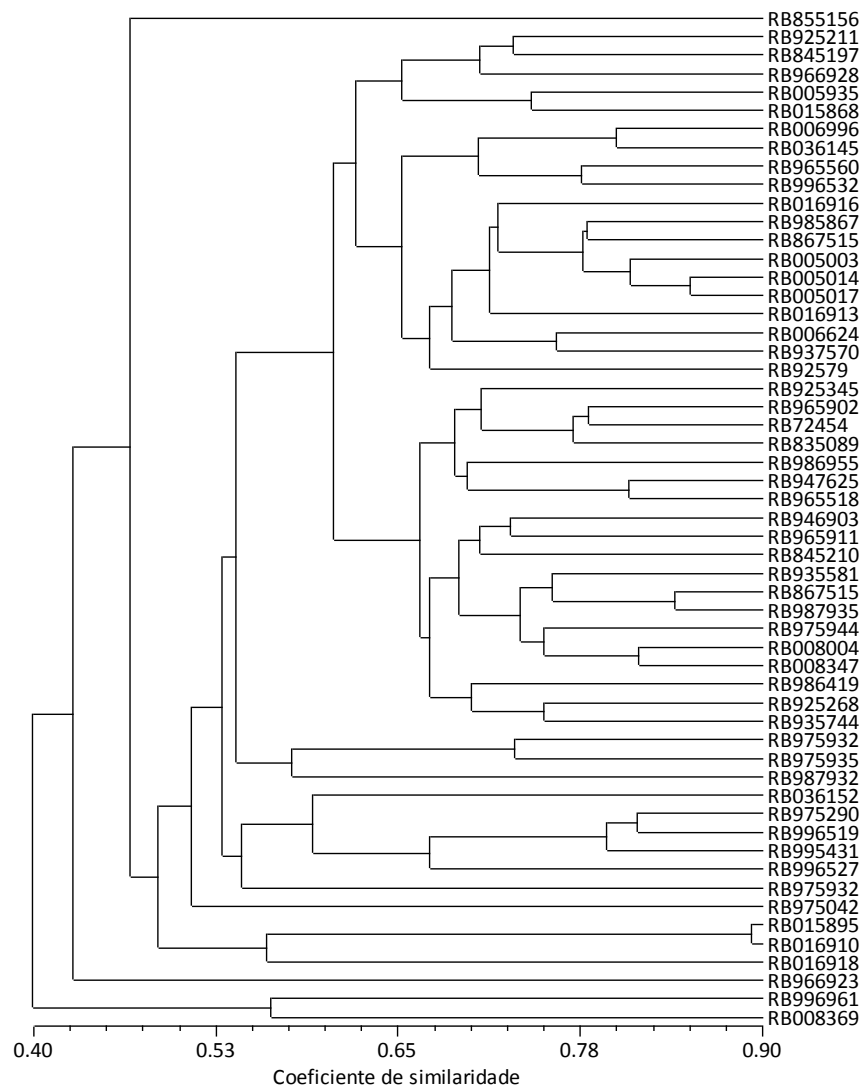


Figura 1. Dendrograma representando o relacionamento entre 55 genótipos de cana-de-açúcar baseado em um agrupamento UPGMA a partir de 16 locos de marcadores microssatélites. Similaridade média de 56% e coeficiente de correlação cofenético de 0,84. Fepagro Serra do Nordeste, Caxias do Sul, 2014.

CONCLUSÕES

Foi encontrada variabilidade genética moderada entre os genótipos avaliados com o



simpósio estadual de AGROENERGIA

V reunião técnica de agroenergia - RS

conjunto de marcadores moleculares utilizados.

AGRADECIMENTOS

FINEP e Embrapa Clima Temperado.

REFERÊNCIAS

DEBNATH, S. C.; KHANIZADEH, S.; JAMIESON, A. R.; KEMPLER, C. Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) markers to assess genetic diversity and relatedness within strawberry genotypes. **Canadian Journal of Plant Science** v. 88, n. 2, p. 313–322, 2008.

DIAS, L.A.S. Análises multidimensionais. In: ALFENAS, A.C. (Ed.). **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos**. Viçosa: UFV, 1998.p.405-473.

SANTOS, J. M. dos; DUARTE-FILHO, L. S. C.; SORIANO, M. L.; DA SILVA, P. P.; NASCIMENTO, V. X.; DE SOUZA-BARBOSA, G. V.; TODARO, A. R.; RAMALHO-NETO, C. E.; ALMEIDA, C. Genetic diversity of the main progenitors of sugarcane from the RIDESA germplasm bank using SSR markers. **Industrial Crops and Products** v. 40, p. 145–150, 2012.

ISOBE, S. N.; HIRAKAWA, H.; SATO, S.; et al. Construction of an integrated high density simple sequence repeat linkage map in cultivated strawberry (*Fragaria × ananassa*) and its applicability. **DNA research: an international journal for rapid publication of reports on genes and genomes** v. 20, n. 1, p. 79–92, 2013.

KLEINHOF, A.; KILIAN, A.; SAGHAI MAROOF, M. A.; et al. A molecular, isozyme and morphological map of the barley (*Hordeum vulgare*) genome. **Theoretical and Applied Genetics** v. 86, n. 6, p. 705–712, 1993.

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

SINGH, R. K.; MISHRA, S. K.; SINGH, S. P.; MISHRA, N.; SHARMA, M. L. Evaluation of microsatellite markers for genetic diversity analysis among sugarcane species and commercial hybrids. **Australian Journal of Crop Science** v. 4, n. 2, p. 115–124, 2010.

SMIULLAH, F. A. K.; AFZAL, A.; ABDULLAH, A. I.; IJAZ, U. Diversity analysis of sugarcane genotypes by microsatellite (SSR) markers. **International Journal of Biotechnology and Molecular Biology Research** v. 4, n. 7, p. 105–110, 2013.