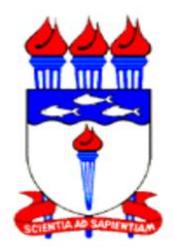


LUIZ SÉRGIO COSTA DUARTE FILHO

**Associação de marcadores moleculares microssatélites com o teor de fibra em
cana-de-açúcar**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**



RIO LARGO - ESTADO DE ALAGOAS

2011

LUIZ SÉRGIO COSTA DUARTE FILHO

**Associação de marcadores moleculares microssatélites com o teor de fibra em
cana-de-açúcar**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Produção Vegetal do Centro de Ciências Agrárias (CECA), Universidade Federal de Alagoas, como requisito à obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Cícero Carlos de Souza Almeida

RIO LARGO - ESTADO DE ALAGOAS

2011

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecária Responsável: Fabiana Camargo dos Santos

D812a Duarte Filho, Luiz Sérgio Costa.
Associação de marcadores moleculares microssatélites com o teor de fibra em cana-de-açúcar / Luiz Sérgio Costa Duarte Filho. – 2011.
29 f.

Orientador: Cícero Carlos de Souza Almeida.
Dissertação (mestrado em Agronomia : Produção vegetal) – Universidade Federal de Alagoas. Centro de Ciências Agrárias. Rio Largo, 2011.

Bibliografia: f. 24-29.

1. Agroenergia. 2. Cana-de-açúcar – Diversidade genética. 3. Cana-de-açúcar – Biomassa. 4. Marcadores moleculares microssatélites. I. Título.

CDU: 633.61:575.2

ALAGOAS, BRASIL 2011

Dedico este trabalho a minha Mãe Lucivânia Nunes.

A minha namorada Danila Alcântara pelo apoio incondicional.

*Em memória ao meu Pai e minha Vovó Nazinha,
por serem os pioneiros em minha educação e meu primo/irmão Fernando Cesar Junior.*

A minha família, pelo constante apoio e compreensão.

AGRADECIMENTOS

À Deus por ter abençoado...

A Coordenação do Curso de Mestrado em Produção Vegetal da Universidade Federal de Alagoas.

A FAPEAL, pela concessão da bolsa de estudo.

A meu orientador Prof. Dr. Cícero Carlos de Souza Almeida, principal responsável por tudo que aprendi ao longo de minha formação como Mestre.

Ao Professore Dr. Cícero Eduardo Ramalho Neto pela amizade, esclarecimentos e dedicação com a pesquisa.

Ao PMGCA do CECA-UFAL pelo reconhecido auxílio ao longo do curso, proporcionando os recursos e o incentivo para a realização dessa pesquisa.

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal da UFAL pelos ensinamentos transmitidos ao longo do curso.

Aos amigos do PMGCA: João Messias Santos, Paulo Pedro da Silva e Geraldo Veríssimo.

Aos amigos do Laboratório de Biotecnologia Vegetal Velber Xavier e Marina Soriano, por compartilhar o ambiente de trabalho, tornando-o prazeroso.

RESUMO

A cana-de-açúcar apresenta elevado potencial para a produção de biomassa. Parte dessa fonte de energia é na forma de sacarose, utilizada para a produção de açúcar e etanol. Desse processo, os resíduos ou bagaço gerados (constituído de fibra), são usados para a co-geração de eletricidade, onde o Brasil possui no total 2.529 empreendimentos em operação, gerando 116.611.624 kW de potência/ano onde está prevista para os próximos anos uma adição de 46.987.830 kW na capacidade de geração do País, proveniente dos 137 empreendimentos atualmente em construção e mais 504 outorgadas (UDOP,2011). As atuais variedades de cana-de-açúcar apresentam uma variação para o teor de fibra, sendo possível desenvolver variedades com teores mais elevados de fibra, sem ocorrer grandes perdas na quantidade de sacarose, o que poderia comprometer a produção de açúcar. Para isso, é indispensável que exista variabilidade genética, permitindo que haja seleção de genótipos superiores para a característica em questão. O objetivo deste trabalho foi desenvolver um sistema de marcadores moleculares do tipo SSR associados ao teor de fibra e analisar a variabilidade genética de cana-de-açúcar de genótipos constiuíntes do banco de germoplasma da Serra do Ouro, Murici, Alagoas, Brasil. Foram analisados 15 acessos de cana-de-açúcar com 22 iniciadores SSR. Os resultados mostraram um número de alelos variando de 3-12 por indivíduo, com PIC médio entre os primers de 0,794, mínimo de 0,434 (SCC92) e máximo de 0,951 (SCC76). O poder discriminatório dos primers mostraram uma média de 0,779, em que SCC76 apresentou um (Dj) máximo de 0,947. A probabilidade de confusão variou de 0,052 a 0,607 nos primers SCC76 e SCC92 respectivamente, com media de 0,220, com um “r” de 0.47 que sugere uma alta correlação usando os primers SCC72 e SCC92. O uso de SSR apresentou eficiência para determinar perfil genético aos acessos analisados e suas correlações junto às características analisadas, podendo ser utilizado como um dos sistemas para obtenção de novas variedades com características de interesse como é o caso da fibra.

Palavras-chave: Agroenergia, cana-de-açúcar, diversidade genética, microssatélites.

ABSTRACT

The cane sugar has a high potential for biomass production. Part of this energy source is in the form of sucrose, used to produce sugar and ethanol. In this process, the waste or residue generated (consisting of fiber), are used for the cogeneration of electricity, where Brazil has a total of 2,529 enterprises in operation, generating 116,611,624 kW / year which is scheduled for the next year an addition of 46,987,830 kW in generating capacity in the country, from the 137 projects currently under construction and more than 504 granted (UDOP, 2011). The current varieties of cane sugar present a variation to the fiber, it is possible to develop varieties with higher levels of fiber, without the occurrence of large losses in the amount of sucrose, which could compromise the production of sugar. Therefore, it is essential that there is genetic variability, allowing for selection of superior genotypes for the trait in question. The objective of this study was to develop a system of type SSR markers associated with fiber content and analyze the genetic variability of sugar cane genotypes constituents the germplasm bank of Sierra Gold, Murici, Alagoas, Brazil. We analyzed 15 accessions of cane sugar with 22 SSR primers. The results showed a number of alleles ranging from 3-12 per individual, with average peak between the primers of 0.794, minimum 0.434 (SCC92) and maximum 0.951 (SCC76). The discriminatory power of the primers showed an average of 0.779, which showed a SCC76 (DJ) up to 0.947. The likelihood of confusion ranged from 0.052 to 0.607 in SCC76 and SCC92 primers respectively, with average of 0.220, with an "r" of 0.47 which suggests a high correlation using primers SCC72 and SCC92. The use of SSR was efficient to determine access to genetic profile analyzed and their correlation with the characteristics analyzed, can be used as a system for obtaining new varieties with traits of interest such as the fiber.

Keywords: Agro-energy, sugar cane, genetic diversity, microsatellites.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AFLP – POLIMORFISMO DE COMPRIMENTO DE FRAGMENTO AMPLIFICADO

COPERSUCAR – COOPERATIVA DE PRODUTORES DE CANA-DE-AÇÚCAR, AÇÚCAR E ÁLCOOL.

CTC – CENTRO TECNOLÓGICO CANAVIEIRO

DNA – ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLÉICO

IAC – INSTITUTO AGRONÔMICO DE CAMPINAS

MAPA – MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO

PCR – REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE

PMGCA – PROGRAMA DE MELHORAMENTO GENÉTICO DA CANA-DE-AÇÚCAR

PRO-ALCOOL – PROGRAMA DE ÁLCOOL DO BRASIL

RAPD – RANDOM AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA

RB – REPÚBLICA BRASIL

RFLP – RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM

RIDESIA – A REDE INTERUNIVERSITÁRIA PARA O DESENVOLVIMENTO DO SETOR SUCROALCOOLEIRO

SNP – POLIMORFISMO E NUCLEOTÍDEO ÚNICO

SNPC – SERVIÇO NACIONAL DE PROTEÇÃO DE CULTIVARES

SP – SÃO PAULO

SSR – SENQUÊNCIA SIMPLES REPETIDA

UDOP – UNIÃO DOS PRODUTORES DE BIOENERGIA

ÚNICA – UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DEAÇÚCAR

UPOV – UNION FOR THE PROTECTION OF NEW VARIETIES OF PLANTS

SUMÁRIO

Agradecimentos.....	II
Resumo.....	III
Abstract.....	IV
Listas de Siglas e Abreviaturas.....	V
1. Introdução.....	01
2. Fundamentação teórica.....	03
2.1. Importância econômica da cana-de-açúcar.....	03
2.2. Origem e domesticação.....	03
2.3. Sistemática e taxonomia.....	05
2.4. Melhoramento genético da cana-de-açúcar no Brasil	06
2.5. Estimativa da variabilidade genética.....	08
2.6. Geração de energia elétrica a partir de cana-de-açúcar.....	10
2.7. Genômica em cana-de-açúcar.....	10
2.8. Marcadores moleculares em cana-de-açúcar.....	11
3. Referência bibliográfica.....	12
4. Artigo.....	17
Resumo.....	18
Introdução.....	19
Materiais e métodos.....	20
Resultados.....	25
Discussão.....	30
Conclusão.....	33
Agradecimentos.....	34
Referências.....	34

1. INTRODUÇÃO

A produção de bioenergia tem aumentado de forma significativa nos últimos anos devido ao elevado preço da energia e a diminuição dos recursos naturais. Alternativas foram desenvolvidas para a produção de bioenergia, entre elas, a obtenção através da conversão de biomassa de plantas cultivadas em biocombustíveis e eletricidade.

Durante séculos, a cultura da cana-de-açúcar apresentou grande importância para produção de açúcar e nas últimas décadas tem se mostrado ser uma importante fonte de energia renovável. O Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo, com cerca de 624,51 milhões de toneladas (2010/11) (UDOP, 2011), produzindo aproximadamente 38 milhões de toneladas de açúcar e mais de 27.604.120 m³ de etanol. No Brasil, a produção de etanol teve início na década de 70, com a criação do programa brasileiro de etanol, porém, na década de 90 ocorreu uma grande diminuição na produção. Após a criação dos veículos flexíveis houve uma retomada na produção de etanol, aumentando em 60% a produção de etanol entre as safras de 2010 a 2011 superando o crescimento de açúcar que foi de 52% no mesmo período (UDOP, 2011). A estimativa é que em 2020 o bio-combustível representará 30% da energia global, que atualmente está próximo de 2% (International Energy Agency, 2005). Nesse cenário, a cana-de-açúcar tem papel relevante, devido a sua grande capacidade de produzir biomassa.

O etanol não tem sido a única forma de obtenção de energia a partir de cana-de-açúcar. Devido à sua elevada produção de biomassa, ocorreu aumento na produção do bagaço (fibra), sendo essa fibra utilizada para co-geração de eletricidade, após processamento da cana-de-açúcar na indústria. Atualmente, a eletricidade produzida de cana-de-açúcar está em torno de 2 Gigawatts, sendo somente 3% da necessidade brasileira. Com o aumento da produção de biomassa, essa co-geração de eletricidade poderá atingir 20 Gigawatts. No Brasil, a bio-eletricidade da cana-de-açúcar apresenta relevante importância pelo fato da colheita coincidir com a estação de pouca disponibilidade de energia, pelo fato de 90% da eletricidade brasileira ser oriunda das hidroelétricas, que sofre grande sazonalidade nos níveis dos reservatórios (Scaramucci *et al.*, 2006).

Nas atuais variedades de cana-de-açúcar, o teor de fibra está próximo de 12 a 14%, podendo atingir um patamar de até 28%, sendo que as variedades que possuem

alto teor de fibra 25 a 26%, apresentam baixo teor de sacarose (4 a 6%) e as variedades que possuem fibra baixa (10 a 12%) apresenta elevado teor de sacarose (PMGCA, 2008 – comunicação pessoal), (Cobillat *et al.*, 2005). Sendo assim, o desenvolvimento de variedades de cana-de-açúcar deverá apresentar três cenários: a) teor de sacarose baixo (4 a 7%) e alto teor de fibra (25 a 26%); b) quantidade de sacarose alta (20 a 22%) e teor de fibra baixo (10-12%) e c) variedades com equilíbrio no teor de fibra de sacarose, com cerca de 18 a 20% de sacarose e de 15 a 18% de fibra. As variedades comerciais de cana-de-açúcar são oriundas de diversas gerações de cruzamentos entre híbridos originários da hibridação entre as espécies *S. officinarum* e *S. spontaneum*, promovendo uma grande variação genética na contribuição dessas espécies nos atuais clones. O genoma de *S. officinarum* contribui com as características “nobres”, como teor de sacarose, já a espécie *S. spontaneum* contribui com a rusticidade, de suma importância para o cultivo (Cuadrado *et al.*, 2004; D’hont *et al.*, 1996, Jannoo *et al.*, 2004).

As variedades RB (República do Brasil), que ocupam cerca de metade de toda a área plantada no Brasil, são obtidas dos cruzamentos entre os acessos do Banco de Germoplasma “Serra do Ouro”. Esse banco de germoplasma possui cerca de 2500 acessos, no entanto, não se conhece a variabilidade genética para teor de fibra nesses acessos e para o melhoramento a variabilidade genética é crucial para o desenvolvimento de novas variedades. Desta forma, a detecção da variabilidade permitirá melhor planejamento dos cruzamentos e maiores sucessos em ganho genético.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. Importância econômica da cana-de-açúcar

O açúcar tem sido o principal produto obtido por meio do cultivo da cana-de-açúcar, no entanto, a inovação tecnológica em busca de combustíveis de origem vegetal, incidida nos últimos anos, consolidou economicamente o etanol no mercado nacional e internacional. Neste contexto, o destino produtivo obtido por meio do cultivo sucroalcooleiro, seja para produção de açúcar ou etanol, torna-se dependente da demanda e da oscilação do valor no mercado, possibilitando desta forma definir o destino produtivo sem danos, já que a produção de etanol pode advir da fermentação do açúcar já produzido. Além destes, outros subprodutos como o melaço, a cachaça e o bagaço possuem pouco destaque econômico, porém a utilização do bagaço na queima para obtenção de energia, torna-se um fator bioenergético cada vez mais abordado.

Na safra 2007/2008 o setor sucroalcooleiro foi responsável por uma renda bruta anual que gira em torno de US\$ 20 bilhões, aproximadamente 54% deste valor foi gerado por meio da comercialização de etanol, 44% por meio da comercialização do açúcar e 2% pela comercialização da bioenergia gerada nas usinas e comercializadas nacionalmente. A comercialização do açúcar se consolidou principalmente no mercado externo, destacando a Rússia como principal importador, adquirindo cerca de 4,3 milhões de toneladas de açúcar bruto, desta forma 65% das vendas foi destinada a exportação, enquanto aproximadamente 35% destinaram-se ao mercado interno. Em contra partida, 85% do etanol comercializado se destinou ao mercado interno, enquanto 15% da renda foi destinado a exportação (ÚNICA, 2009).

2.2. Origem e domesticação

Relatos apontam que a cana-de-açúcar se originou no Sudeste da Ásia e Nova Guiné (Lebot, 1999). Modernos cultivares de cana (*Saccharum* spp.) são híbridos aneuplóides (quando partes ou cromossomos inteiros estão ausentes a partir de um genoma, ou presentes em excesso) e poliplóides originários do cruzamento entre as espécies *S. officinarum* e *S. spontaneum*, e em alguns casos de *S. sinense Roxb.* ou *S. barberi* Jeswiet (Aitken *et al.*, 2005; Cordeiro *et al.*, 2006; Edme *et al.*, 2005; Grivet e Arruda., 2002; Singh *et al.*, 2010).

Espécies de *Saccharum* se reproduzem a partir de sementes verdadeiras, gemas nodais e de rizomas. Os perfilhos da planta surgem das gemas nodais ou rizomas para formar uma touceira de colmos. O rizoma é bem desenvolvido em *S. spontaneum*, podendo formar densos entrelaçamento de raízes, de difícil erradicação. Assim, *S. spontaneum* perfilha profusamente enquanto que *S. officinarum* tem uma baixa capacidade de perfilhamento. O ângulo em que os perfilhos surgem, contribui para o hábito de crescimento de um determinado clone, podendo ter hábito de crescimento ereto, decumbente ou reclinado. O sistema radicular geralmente se espalha para cerca de 8 metros de raio e 10-15 metros de profundidade (Alfonse e Balasundaram, 2006).

Até o século XX, a espécie *S. officinarum* foi amplamente cultivada em diversos países, no entanto, objetivando elevar a produtividade e ampliação da área produtiva, diversos estudos divulgaram aspectos relacionados ao florescimento e a formação de sementes em cana-de-açúcar (Rao, 1989). Devido à necessidade de obtenção de vegetais resistentes a doenças, cientistas da Índia e de Java, por meio de estudos contínuos com hibridização, desenvolveram híbridos interespecíficos entre as espécies polipóides *S. officinarum* e *S. spontaneum*, conservando as características nobres presentes na *S. officinarum* e adicionando as características rústicas presentes na *S. spontaneum* (Figura 1) (Ming *et al.*, 2006).

A espécie *S. spontaneum* possui número cromossômico total ($2n$), variando de 40 a 128, com $x=8$, podendo possuir de cinco a dezesseis cópias de cada um dos oito cromossomos enquanto a espécie *S. officinarum* possui número cromossômico ($2n$) iguala 80, com $x=10$, o que significa ter oito cópias de cada um dos dez cromossomos (Asano *et al.*, 2004).

A característica genética dos híbridos interespecíficos da geração F1 ocorre pela transmissão de células $2n + n$ para formação das sementes híbridas. Este fato ocorreu devido a uma falha durante o processo meiótico, não ocorrendo à redução cromossômica, tornando gametas iguais às células somáticas. Desta forma, o óvulo anormal de *S. officinarum* foi fecundado pelo pólen haplóide advindo de *S. spontaneum* (Allard, 1960)

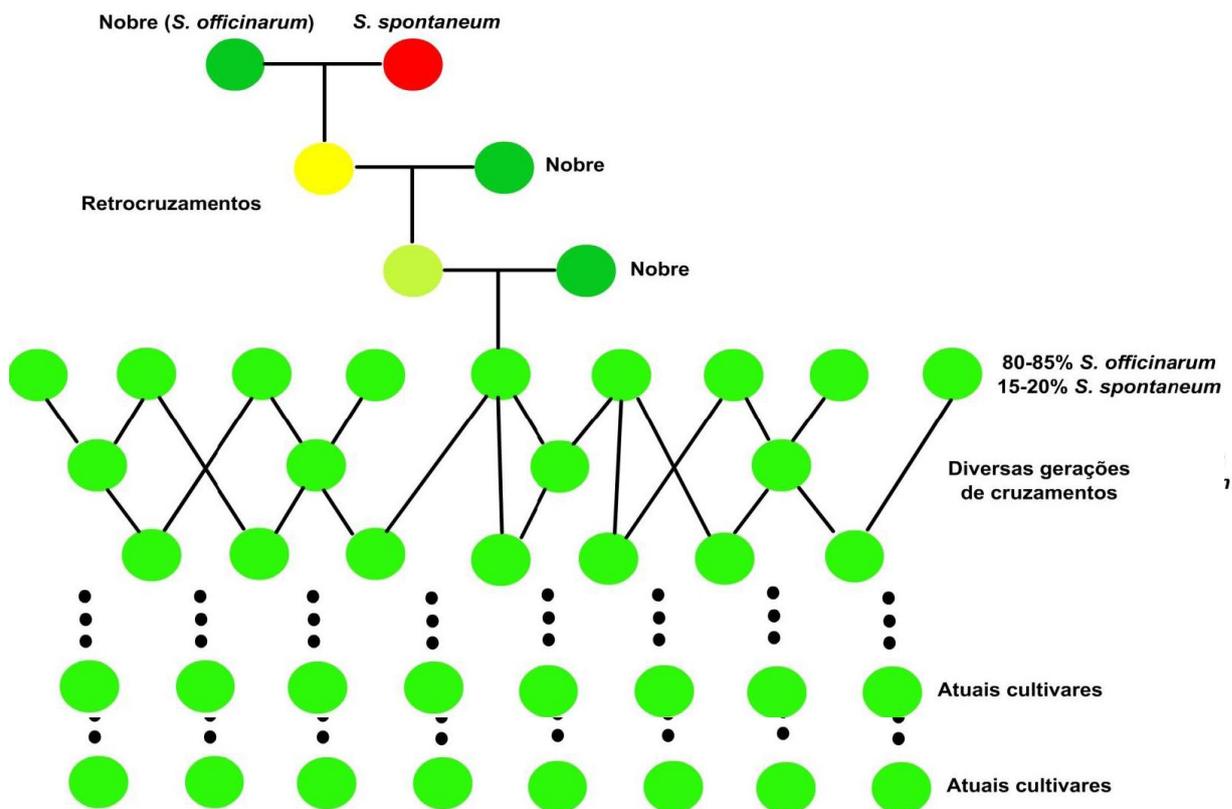


Figura 1. Origem dos cultivares atuais de cana-de-açúcar. Este esquema mostra os cruzamentos interespecíficos entre *S. officinarum* e *S. spontaneum* até na formação dos híbridos atuais (Adaptação de Cicero Carlos de Souza Almeida., 2011).

Com a finalidade de concentrar maior descendência genética nobre nos híbridos da primeira geração, diversos retrocruzamentos, efetuados de maneira sucessiva, foram realizados utilizando a espécie *S. officinarum*, como consequência, cerca de 80% das características genéticas presentes nos híbridos de cana-de-açúcar procedem de *S. officinarum* (Grivet *et al.*, 2004).

2.3. Sistemática e taxonomia

A cana-de-açúcar é classificada como uma planta alógama, da família Gramineae (Poaceae), tribo Andropogoneae e gênero *Saccharum*. Cinco espécies do gênero e outros estreitamente relacionados (*Erianthus*, *Narenga* e *Sclerostachya*) têm sido agrupados sob o complexo *Saccharum*, que representa o conjunto de genes compartilhados a partir do qual evoluiu *S. officinarum* (Sobral *et al.*, 1994).

Cultivares de cana-de-açúcar são obtidos a partir de um número limitado de eventos de hibridação interespecífica entre *S. officinarum* ($2n = 80$, número cromossômico básico $x = 10$) e *S. spontaneum* ($2n = 48-124$, número cromossômico básico $x \frac{1}{4} 8$) (Berding e Roach, 1987).

A taxonomia de plantas cultivadas é mais difícil, principalmente na cana-de-açúcar devido ao extenso processo de hibridação e da alta taxa de mutação, que levaram a uma considerável diversidade em seus padrões de variação. A identidade taxonômica e delimitação das espécies são complicadas devido às seguintes razões: (a) hibridação natural entre populações de gêneros e espécies que crescem juntas e florescem simultaneamente em algumas áreas, resultando na existência de uma série de formas intermediárias; (b) diferentes tipos de transmissão cromossômica em hibridação natural e constante evolução de novas variantes ou tipos; (c) polimorfismo devido a uma série de euploides e aneuploides (como em *S. spontaneum*) e (d) pressões de seleção, devido à natureza e ao homem (Alfonse e Balasundaram, 2006).

Ainda de acordo com ALFONSE e BALASUNDARAM (2006) os gêneros e espécies são separados e identificados principalmente com base em caracteres florais, porque eles são mais estáveis, enquanto as características de reprodução vegetativa podem ser influenciadas por mudanças ambientais.

2.4. Melhoramento genético da cana-de-açúcar no Brasil

O melhoramento da cana-de-açúcar iniciou em meados da década de 1920, por meio do Instituto Agrônomo de Campinas, sendo este responsável pelos primeiros cultivares desenvolvidas em território nacional, identificadas pela sigla do IAC (Figueiredo, 2008). A partir da década de 1970 foi criado o Planalsucar e a Copersucar, o primeiro programa originou as variedades RB (República do Brasil), sendo administrado a partir da década de 1990 pelas Universidades e renomeado para RIDESA, ocupando atualmente 58% dos canaviais do país (RIDESA, 2010). O segundo programa originou as variedades SP (São Paulo), porém, em 2004 foi reestruturado e renomeado para Centro de Tecnologia Canavieira, originando cultivares com o prefixo CTC (COPERSUCAR, 2011). Em 2003 surge o mais novo programa de melhoramento canavieiro do país a empresa CanaVialis S.A (CANAVIALIS, 2010).

O processo de desenvolvimento de novas variedades de cana-de-açúcar consiste inicialmente na seleção dos progenitores por meio dos acessos presente em um banco de germoplasma com diversidade gênica elevada. Cruzamentos biparentais ou multiparentais tem sido a principal estratégia dos programas de melhoramento. No cruzamento biparental se conhece os dois progenitores, já no multiparental somente o progenitor feminino é conhecido (Landell e Bressiani, 2008). A partir das características desejadas, realiza-se a seleção dos melhores indivíduos que unam entre vários fatores, produtividade e resistência a pragas e doenças. O registro das novas variedades é a ultima etapa do processo de desenvolvimento de novos cultivares, fator este, responsável por garantir os direitos científicos sobre o desenvolvimento de um novo cultivar (Bernet *et al.*, 2003).

No Brasil, ficou instituído o direito de Proteção de Cultivares, de acordo com o estabelecido pela Lei Nº 9.456, promulgada em 25 de abril de 1997. Por meio desta, o Serviço Nacional de Proteção de Cultivares (SNPC), órgão criado junto ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), torna-se responsável por garantir a proteção das novas variedades de plantas desenvolvidas e cultivadas o país. Quanto aos cultivares pertencentes ao gênero *Saccharum* desenvolvidas no Brasil, registrou-se 91 cultivares, até o momento, com proteção definitiva pelo prazo de 15 anos (MAPA, 2011).

Internacionalmente, os direitos dos cultivares brasileiros são assegurados pela a UPOV (*Union for the Protection of New Varieties of Plants*). Esta organização intergovernamental foi criada em Paris em 1961 e possui sede atual em Genebra na Suíça. O desenvolvimento desta organização fornece e promove um sistema eficaz de proteção das variedades vegetais, com o objetivo de incentivar o desenvolvimento de novas variedades de plantas. Assim, a UPOV, atualmente constituída por 65 países membros, propõe normas e direitos aos países que a constitui, promovendo a proteção de cultivares de plantas (UPOV, 2010).

O processo de identificação e proteção de indivíduos vegetais comumente é baseado na avaliação de caracteres morfológicos e fisiológicos denominados descritores (Gallacher, 1997). Estes descritores são habitualmente influenciados por fatores abióticos, possibilitando informações imprecisas, impossibilitando características suficientes para discriminação genotípica (Giancola *et al.*, 2002).

Metodologicamente mais específico, os marcadores moleculares são utilizados nas ciências humanas e forenses com elevada precisão de informações gênicas (Schumm *et al.*, 1998). Desta forma, a utilização desta ferramenta junto aos programas de melhoramento genético de cana-de-açúcar, possibilitará maior eficiência no processo de proteção.

2.5. Estimativa da variabilidade genética

O uso de técnicas de genética molecular permite analisar a variabilidade em nível de DNA, resultando em um agrupamento de indivíduos com características semelhantes, proporcionando planejar os cruzamentos, obtendo melhores resultados em um tempo menor (Messias dos Santos, 2011 - Comunicação pessoal).

Um marcador molecular é definido como um segmento específico do DNA que é representante ou não das diferenças em nível do genoma (Messias dos Santos, 2011 - Comunicação pessoal). Marcadores moleculares podem ou não se correlacionar com expressão fenotípica de uma característica. Os marcadores moleculares oferecem numerosas vantagens em relação às alternativas convencionais baseadas no fenótipo, pois são estáveis e detectáveis em todos os tecidos independentemente do estágio da planta e não se confundindo com efeitos ambientais, pleiotrópicos ou epistático (Agarwal *et al.*, 2008).

Diversos processos em genética molecular têm sido criados para caracterizar genótipos, sendo os marcadores moleculares de DNA os mais corriqueiros (Messias dos Santos, 2011 - Comunicação pessoal). O primeiro método desenvolvido para identificação de marcadores baseados em DNA foi o RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*). Este marcador se baseia na diferença de comprimentos de DNA gerados quando clivados com a mesma enzima de restrição, diferindo no tamanho de pares de bases entre indivíduos, devido a possíveis alterações nos sítios de restrição, como deleções, translocações e inversões. Com a descoberta da PCR (*polimerase chain reaction*) vários marcadores foram desenvolvidos como o RAPD (*random amplified polymorphism DNA*) que utiliza iniciadores (*primers*) arbitrários que amplificam seqüências-alvos desconhecidas. O AFLP (*amplified fragment length polymorphism*), que se baseia na clivagem do DNA genômico com enzimas de restrição, seguida da ligação com adaptadores específicos, uma pré-amplificação, seguindo de uma amplificação seletiva via PCR com *primers* específicos e separação dos fragmentos

gerados em gel de alta resolução. Outro tipo de marcadores baseado em PCR é SSR (*simple sequence repeats*) (Garcia *et al.*, 2006) (Tabela 1).

Os marcadores SSR apresentam algumas vantagens: são encontrados com frequência nos genoma, são distribuídos no genoma de muitos organismos eucariontes, geralmente mostram um alto nível de polimorfismo e são codominantes (identificam indivíduos heterozigotos). A implantação de SSR necessita apenas da metodologia de PCR e uma pequena quantidade de DNA. Por essas razões, os maçadores do tipo microssátelites são mais aplicáveis para seleção assistida por marcadores moleculares do que outro sistema de marcadores genéticos (Ek *et al.*, 2005).

Tabela 1. Característica dos principais tipos de marcadores moleculares (Agarwal *et al.*, 2008).

Características	Principais	Tipos de	Marcadores	Moleculares	
	RFLP	RAPD	AFLP	SSR	SNP
PCR	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
Enzimas de restrição	Sim	Não	Sim	Não	Não
Polimorfismo	Moderado	Moderado	Moderado	Alto	Variável
Abundância	Moderado	Moderado	Moderado	Moderado	Alta
Tipo de Marcador	Codominante	Dominante	Dominante	Codominante	Codominante
Automatização	Não	Sim	Sim	Sim	Sim
Lócus	Poucos	Muitos	Muitos	1 a 20	Milhares
Disponibilidade no genoma	Alta	Alta	Alta	Média	Alta
Equipamento especializado	Isótopo radiativo	Gel de agarose	PAGE ou capilar	PAGE ou capilar	PAGE, matrizes, espectrofotômetro de massa ou leitores de placa
Custo	Alto	Baixo	Médio	Médio/Alto	Alto
Reprodutibilidade	Alto	Baixo	Médio/Alto	Alto	Alto

O alto grau de variação alélica revelada por estes marcadores resultam das diferenças no número de unidades de repetição causada por crossing-over ou pelo deslizamento da DNA polimerase durante a replicação (Selvi *et al.*, 2003).

2.6 Geração de energia elétrica através de fibra proveniente de cana-de-açúcar

Apesar de sua importância histórica a atividade canavieira tornou-se relevante apenas após a criação do Programa de Álcool do Brasil (PRO-ALCOOL) em meados dos anos 70. A produção de álcool não é hoje tão importante para o setor de combustíveis do Brasil quanto foi nos anos 70 e 80, pois com a chegada dos veículos flex houve uma diminuição contante nos últimos 15 anos. A cana-de-açúcar industrial tornou-se mais flexível, podendo transferir a produção de açúcar para álcool e vice-versa, dependendo do comportamento do mercado de preços nacionais e internacionais. O Brasil é muito competitivo em relação ao mercado de açúcar internacional, mais o comércio do etanol depende dos altos impostos que o setor impõe em relação à gasolina. A Produção de eletricidade em sistema de cogeração de cana-de-açúcar no Brasil, com base no bagaço, como é tradicional em muitos outros países. No entanto em 2011 a capacidade de produção de eletricidade instalada proveniente de biomassa foi de (8.517 MW) e a capacidade de produção de eletricidade disponível é apenas de 7,35% no país (UDOP, 2011).

A energia elétrica no Brasil é produzida essencialmente por unidades agro-industriais de auto consumo, sendo o excedente da eletricidade vendido a rede (cerca de 40 MW) irrelevante em comparação a capacidade instalada (cerca de 100 MW). Por outro lado a produção de energia elétrica a partir de resíduos de cana-de-açúcar vem sendo apresentados para muitos anos como uma alternativa de grande potencial.

A maioria da produção de cana-de-açúcar ocorre na região sudeste do país (por exemplo 63 por cento no estado de São Paulo), que também é área mais industrializada, no entanto Alagoas tem sua parcela significativa na produção de açúcar e álcool, principalmente na região Nordeste onde na safra 09/10 produziu 24.269.759 toneladas de cana e 625.785 litros de etanol (UDOP, 2011). A atividade canavieira coincide com o período de seca, quando as usinas hidroelétricas não podem operar com sua capacidade total (no Brasil mais de 90 por cento da geração de energia elétrica é baseada em hidroeletricidade).

2.7 Genômica em cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar possui um banco de dados de sequências ESTs (programa SUCEST-FAPESP), no qual contem sequências específicas originadas de estádios

fisiológicos diversos, como meristemas apicais vegetativos e florais e folhas em diversas fases de desenvolvimento, vários tipos radiculares, sementes, caules, células de calos cultivados, além de tecidos infectados com bactérias simbióticas (Vettore *et al.*, 2001). O SUCEST é uma fonte de dados para ser utilizado no desenvolvimento de marcadores microssatélites, como realizado por (Pinto *et al.*, 2004), que desenvolveram marcadores SSR, obtendo elevado polimorfismo.

2.8 Marcadores moleculares SSR em cana-de-açúcar

Marcadores moleculares podem ser uma rica ferramenta para programas de melhoramento genético de plantas, proporcionando a possibilidade de diminuir o tempo gasto para produzir novas variedades com caracteres agrônômicos desejáveis. Além disso, eles são adequados para estudar a arquitetura genética de características agrônômicas, especialmente as complexas (Pinto *et al.*, 2010; Sousa *et al.*, 2010)

O melhoramento molecular da cana começou no final da década de oitenta, quando geneticistas e melhoristas examinaram vários tipos de marcadores de DNA e sua utilidade no melhoramento genético da cana-de-açúcar (Pan, 2006).

No entanto a cana-de-açúcar ficou atrás de outras culturas na utilização de marcadores moleculares, por causa de sua genética complexa e pela falta de parentes diplóides com genomas mais simples que poderiam ser explorados para desvendar o genoma da cana-de-açúcar (Alwala *et al.*, 2009). No complexo poliplóide da cana-de-açúcar, a análise dos dados gerados pela amplificação de SSR é tecnicamente mais exigente do que para os organismos mais simples, devido ao padrão de bandas obtidas como resultado de múltiplas cópias que estão presentes nos cromossomos (Glynn *et al.*, 2009). O emprego dessa tecnologia representa uma ferramenta valiosa para a análise do genoma podendo contribuir para aumentar o rendimento e eficiência em programas de melhoramento genético da cana-de-açúcar.

Em 1997, foi feito um esforço pelo Consórcio Internacional para a biotecnologia da cana-de-açúcar para desenvolver e avaliar sequências SSR. Marcadores foram desenvolvidos a partir de uma biblioteca enriquecida de microssatélites mostrando ter a capacidade de distinguir entre os genótipos de cana de-açúcar devido à sua habilidade de detectar grande número de alelos (Cordeiro *et al.*, 2000).

Já em 2001 foi concluído o projeto Sucest, que permite uma avaliação global da expressão de genes em cana, já que abrange 26 bibliotecas de cDNA de raízes, plântulas, caules, folhas, flores e sementes, bem como calos submetidos a estresses abióticos e mudas infectadas com bactérias diazotróficas endofíticas (VETTORE *et al.*, 2001).

3. Referências

(CANAVIALIS S.A). Canavialis. Disponível em: <<http://www.Canavialis.com.br/src/>>. Acesso em: 20 abril. 2010.

(COPERSUCAR S.A.) Copersucar Disponível em: <<http://www.copersucar.com.br>> Acesso em: 01 maio 2011.

(MAPA) Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 04 fevereiro 2011

(RIDESA S.A.) Ridesa Disponível em: <<http://www.ridesa.com.br/?pagina=melhoramento>> Acesso em 12 dezembro 2010.

(UPOV) Union for the Protection of New Varieties of Plants. Disponível em: <http://www.upov.int/index_en.html>. Acesso em: 21 junho 2010.

(UDOP S.A.) Udop Disponível em: <<http://www.udop.com.br/index.php?item=alcool>> Acesso em 17 novembro 2011.

(UNICA.) União da Indústria de Cana-de-açúcar. A Indústria da Cana-de-açúcar. Disponível em: <<http://www.unica.com.br/multimedia/publicacao/Default.asp?sqlPage=2>>. Acesso em: 19 março 2009.

Agarwal M, Shrivastava N, Padh H 2008. Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. *Plant Cell Rep* 27: 617–631.

Aitken K S, Jackson P A, Mcintyre C L A 2005. Combination of AFLP and SSR markers provides extensive map coverage and identification of homo(eo)logous linkage groups in a sugarcane cultivar. *TheorAppl Genet* 110: 789 – 801.

- Alfonse A V, Balasundaram N 2006. On the taxonomy of the members of 'Saccharum complex'. *Genetic Resources and Crop Evolution* 53: 35 – 41.
- Allard R W, Backcross breeding. In: Allard R W 1960. *Principles of plant breeding*. New York: John Wiley and Sons. 2ed.
- Alwala S, Kimbeng C A, Veremis J C, Gravois K A 2009. Identification of molecular markers associated with sugar-related traits in a *Saccharum* interspecific cross. *Euphytica* 167: 127 – 142.
- Asano T, Tsudzuki T, Takahashi S, Shimada H, Kadowaki K 2004. Complete Nucleotide Sequence of the Sugarcane (*Saccharum Officinarum*) Chloroplast Genome: A Comparative Analysis of Four Monocot Chloroplast Genomes. *Research*, v.11, p.93-99.
- Barbara M 2005. (United States) Mobilizing energy technology. International Energy Agency.
- Berding N, Roach B T 1987. Germplasm collection, maintenance, and use. In: Heinz DJ (Ed) *Sugarcane improvement through breeding*. Elsevier, New York, 143–210
- Bernet G P, Bramardi S, Calvache D, Carbonell E A, Asins M J 2003. Applicability of molecular markers in the context of protection of new varieties of cucumber. *Plant Breeding*. v.122, p.146-152.
- Cobill R M 2005. Evaluation of sweet sorghum as a complementary bioenergy crop to sugarcane in Louisiana. *J. Am. Soc. Sugar Cane Tech.* 26(1): 57-58.
- Cordeiro G M, Elliott F, McIntyre C L, Casu R E, Henry R J 2006. Characterisation of single nucleotide polymorphisms in sugarcane ESTs. *TheorAppl Genet* 113: 331- 343.
- Cordeiro G M, Taylor G O, Henry R J 2000. Characterisation of microsatellite markers from sugarcane (*Saccharum* sp.) a highly polyploid species. *Plant Science* 155: 161.
- Cuadrado A, Acevedo R, Espina M S D, Jouve N, Torre C 2004. Genome remodelling in three modern *Sfficinarum* x *S spontaneum* sugarcane cultivars. *Journal of Experimental Botany* 55 (398): 847- 854.

D'hont A, Grivet L, Feldmann P, Rao S, Berding N, Glaszmann J C 1996. Characterisation of the double genome structure of modern cultivars (*Saccharum*spp.) by molecular cytogenetics. *Molecular Gene Genetics* 250: 405-413.

Edme S J, Miller J D, Glaz B, Tai P Y P, Comstock J C 2005. Genetic contribution to yield in the Florida sugarcane industry across 33 years. *Crop Science* 45: 92–97.

Ek M, Von Post R, Dayteg C, Henriksson T, Weibull P, Ceplitis A, Isaac P, Tuveesson S 2005. Microsatellite markers for powdery mildew resistance in pea (*Pisum sativum* L.). *Hereditas*. v.142, p.86-91.

Figueiredo P 2008. Breve historia da Cana-de-açúcar e do papel do instituto agrônomo no seu estabelecimento no Brasil. In: Dinardo-Miranda L L, Vasconcelos A C M, Landell M G A (Ed.). Cana-de-açúcar. Ribeirão Preto: IAC. 882p.

Gallacher D J 1997. Optimised descriptors recommended for Australian sugarcane germplasm (*Saccharum* spp. hybrid). *Australian Journal of Agricultural Science*.v.48, p.775-779.

Garcia A A F, Ulian E C, Souza A P 2006. Characterization of novel sugarcane expressed sequence tag microsatellites and their comparison with genomic SSRs. *Plant Breeding* 125: 378-384.

Giancola S, Marcucci S P, Poltri S, Lacaze, P, Hopp H E 2002. Feasibility of integration of molecular markers and morphological descriptors in a real case study of a plant variety protection system for soybean. *Euphytica*.v.127, p.95-113.

Glynn N C, McCorkle K, Comstock C 2009. Diversity among mainland USA sugarcane cultivars examined by SSR genotyping. *Journal of the American Society of Sugar Cane Technologists* 29: 36-52.

Grivet L, Arruda P 2002. Sugarcane genomics: depicting the complex genome of an important tropical crop. *Current Opinion in Plant Biology* 5: 122 – 127.

Grivet L, Daniels C, Glaszmann J C, D'hont A 2004. A Review of Recent Molecular Genetics Evidence for Sugarcane Evolution and Domestication. *Ethnobotany Research & Applications*.v.2, p.9-17.

Jannoo N, Grivet L, Seguin M, Paulet F, Domaingue R, Rao P S, Dookun A, D'hont A, Glaszmann J C 1999. Molecular investigation of the genetic base of sugarcane cultivars. *TheorAppl Genet* 99: 171-184.

Landell M G A , Bressiani J A 2008. Melhoramento genético, caracterização e manejo varietal. In: Dinardo-Miranda L L, Vasconcelos A C M, Landell M G A (Ed.). *Cana-de-açúcar*. Ribeirão Preto: IAC. 882p.

Lebot V 1999. Biomolecular evidence for plant domestication in Sahul. *Genetic Resources and Crop Evolution* 46: 619 – 628.

Ming R, Moore P H, Wu K, D'hont, A, Glazmann J C, Tew T L, Mirkov T E, Da Silva, J, Jifon J, Rai M, Schnell R J, Brumbley S M, Lakshmanan P, Comstock J C, Paterson A H 2006. Sugarcane improvement through breeding and biotechnology. *Plant Breeding Reviews*. v.27, p.15-118.

Pan Y B 2006. Highly Polymorphic Microsatellite DNA Markers for Sugarcane Germplasm Evaluation and Variety Identity Testing. *Sugar Tech* 8 (4) 246-256.

Pinto L R, Garcia A A F, Pastina M M, Teixeira L H M, Bressiani J A, Ulian E C, Bidoia M A P, Souza A P 2010. Analysis of genomic and functional RFLP derived markers associated with sucrose content fiber and yield QTLs in a sugarcane (*Saccharum* spp) commercial cross. *Euphytica* 172: 313–327.

Pinto L R, Oliveira K M, Ulian E C, Garcia A A F, De Souza A P 2004. Survey in the sugarcane expressed sequence tag database (SUCEST) for simple sequence repeats. *Genome* 47: 795-804.

Rao J T 1989. Sugarcane origin, taxonomy, breeding and varieties. In: Sreenivasan T V (Ed.). *Sugarcane varietal improvement*. Coimbatore, India. v6, p107-111.

Scaramucci J A, Perin C, Pulino P, Bordoni O F J. G, Cunha M P and Cortez L A B 2006. “Energy from sugarcane bagasse under electricity rationing in Brazil: A computable general equilibrium model”. *Energy Policy* 34 (9) 986–992.

Schumm J W, Micka K A, James W, Katherine A, Rabbach R D 1988. Multiplex amplification of short *tandem repeat loci*. Patente: 5.843.660, EUA.

Selvi A, Nair N V, Balasundaram N, Mohapatra T 2003. Evaluation of maize microsatellite markers for genetic diversity analysis and fingerprinting in sugarcane. *Genome* 46: 394-403.

Singh R K, Mishra S K, Singh S P, Mishra N, Sharma M L 2010. Evaluation of microsatellite markers for genetic diversity analysis among sugarcane species and commercial hybrids. *Australian Journal de Crop Science* 4 (2): 116-125.

Sobral B W S, Braga D P V, Lahood E S, Keim P 1994. Phylogenetic analysis of chloroplast restriction enzyme site mutations in the SaccharinaeGrisebsubtribe of the AndropogoneaeDumort tribe. *TheorAppl Genet* 87: 843 853.

Sousa A C B, Jungmann L, Campos T, Sforc D A, Boaventura L R, Silva G M B, Zucchi M I, Jank L, Souza A P 2010 Development of microsatellite markers in Guineagrass

Vettore A L, Da Silva F R, Kemper E L, Arruda P 2001. The libraries that made SUCEST. *Genetics and Molecular Biology* 88: 1-6.

4. Artigo

Correlação entre marcadores moleculares microssatélites e teor de fibra em cana-de-açúcar

Luiz Sérgio Costa Duarte Filho¹, Dennis Crystian da Silva¹, Marislane Carvalho Paz de Souza¹, Geraldo Verissimo², João Messias dos Santos² e Cícero Almeida¹.

¹Laboratório de Recursos Genéticos, Universidade Federal de Alagoas (UFAL),
Campus Arapiraca, Arapiraca-AL, Brasil.

²Programa de Melhoramento Genético da Cana-de-açúcar (PMGCA/RIDES/UFAL),
Brasil.

Endereço de correspondência: Universidade Federal de Alagoas (UFAL), *Campus*
Arapiraca, Avenida Manoel Severino Barbosa S/Nº, Bom Sucesso, CEP 57300-390,
Arapiraca-AL, Brasil

Resumo

Cana-de-açúcar apresenta elevada produtividade, podendo ser utilizada para obter açúcar, etanol e eletricidade a partir do aproveitamento dos resíduos ou bagaço. As atuais variedades de cana-de-açúcar apresentam uma variação para o teor de fibra, sendo possível desenvolver variedades com teores mais elevados para esta característica sem que ocorra grandes perdas na quantidade de sacarose. O objetivo deste trabalho foi selecionar marcadores do tipo SSR, nas sequências de genes expressos no colmo de cana-de-açúcar, com intuito de encontrar marcadores que identifiquem regiões associadas ao teor de fibra e analisar a variabilidade genética em cana-de-açúcar.. Foram analisados 15 acessos de cana-de-açúcar com 21 iniciadores SSR previamente selecionados. Os resultados mostraram número de alelos variando de 3-12 por indivíduo, com um o PIC médio entre os *primers* de 0,79. O poder discriminatório dos *primers* mostrou uma média de 0,78. A correlação com o teor de fibra de 0,47 apresentada pelos marcadores SCC72 e SCC92 sugere alta associação com o fenótipo. O uso de SSR foi eficaz para determinar o perfil genético nos acessos analisados e suas associações com o teor de fibra, podendo ser utilizado para orientar os cruzamentos e elevar a eficiência na obtenção de novas variedades.

Palavras-chave: Agroenergia, cana-de-açúcar, diversidade genética, microssatélites

Introdução

Durante séculos, a cultura da cana-de-açúcar apresentou grande importância para produção de açúcar, e nas últimas décadas tem se mostrado ser uma importante fonte de energia renovável. O Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo, com cerca de 624,5 milhões de toneladas (UDOP, 2011), produzindo aproximadamente 38 milhões de toneladas de açúcar e mais de 27.604.120 m³ de etanol.

O etanol não tem sido a única forma de obtenção de energia a partir de cana-de-açúcar. Com a elevação da produção de biomassa, ocorreu aumento na produção do bagaço (fibra), utilizada para co-geração de eletricidade, após processamento da cana-de-açúcar na indústria. Atualmente, a eletricidade produzida de cana-de-açúcar no Brasil absorve um total de 2.529 empreendimentos em operação, gerando 116.611.624 kW de potência/ano onde está prevista para os próximos anos uma adição de 46.987.830 kW na capacidade de geração do País, proveniente dos 137 empreendimentos atualmente em construção e mais 504 outorgadas (UDOP, 2011). No país, a bio-eletricidade da cana-de-açúcar apresenta relevante importância devido a colheita coincidir com a estação de pouca disponibilidade de energia, pelo fato de 90% da eletricidade brasileira ser oriunda das hidroelétricas que sofre grande sazonalidade nos níveis dos reservatórios (Scaramucci *et al.*, 2006), a produção de bio-eletricidade a partir da biomassa da cana-de-açúcar se mostra como uma grande alternativa para suprir a demanda de eletricidade no período de menor produção de energia pelas hidroelétricas.

Nas atuais variedades de cana-de-açúcar, o teor de fibra está próximo de 12 a 14%, podendo atingir um patamar de até 28%, sendo que as variedades que possuem alto teor de fibra (25-26%), apresentam baixo teor de sacarose (4-6%) e as variedades com sacarose elevada, apresentam fibra baixa (10-12%) (Cobill *et al.*, 2005).

As cultivares comerciais de cana-de-açúcar são oriundas de diversas gerações de cruzamentos entre híbridos originários da hibridação entre as espécies *S. officinarum* e *S. spontaneum*, promovendo uma grande variação genética na contribuição dessas espécies nos atuais clones. O genoma de *S. officinarum* contribui com as características “nobres”, como teor de sacarose, já a espécie *S. spontaneum* contribui com a rusticidade, de suma importância para o cultivo (Cuadrado *et al.*, 2004; D’Hont *et al.*, 1996, Jannoo *et al.*, 2004).

As cultivares RB (República do Brasil), que ocupam cerca de metade de toda a área cultivada no Brasil, são obtidas dos cruzamentos entre os acessos do Banco de Germoplasma “Serra do Ouro”. Esse banco de germoplasma possui cerca de 2700 acessos. No entanto, não se conhece a variabilidade genética para teor de fibra desses acessos, e para o melhoramento a variabilidade genética para as características de interesse é crucial para o desenvolvimento de novas variedades, permitindo a obtenção de materiais heteróticos com características superiores. Desta forma, a detecção da variabilidade para o teor de fibra permitirá melhor direcionamento dos cruzamentos e, conseqüentemente, maiores sucessos em ganhos genéticos.

O objetivo deste trabalho foi selecionar marcadores do tipo SSR, nas sequências de genes expressos no colmo de cana-de-açúcar, com intuito de encontrar marcadores que identifiquem regiões associadas ao teor de fibra e analisar a variabilidade genética em cana-de-açúcar.

Materiais e métodos

Teor de Fibra

Acessos de cana-de-açúcar foram escolhidos das estações experimentais e do banco de germoplasma de cana-de-açúcar “Serra do Ouro” (Murici, Alagoas 09° 15’14”

S e 35° 47'59" W). A seleção desses acessos foi baseada no teor de fibra, sendo todas variedades comerciais. Foram utilizados acessos das estações experimentais do PMGCA/RIDES/UFAL situadas em São Miguel dos Campos, São Luís do Quitunde, Coruripe, ver município e na Estação de Floração e Cruzamento Serra do Ouro, Murici, Brasil.

A variação no teor (%) de fibra dos acessos utilizados no estudo é apresentada na Tabela 1.

Tabela 1. Teor de fibra (%) em 15 acessos de cana-de-açúcar, Brasil.

Acessos	Teor de Fibra %
RB835560	10,46
SP804967	10,52
RB961552	13,47
RB991532	12,78
RB961	11,03
RB9629	15,57
RB971754	13,10
RB971741	13,03
RB72454	13,46
RB971765	14,70
SP791011	13,95
RB991562	14,37
RB991511	14,49
RB845286	15,40
TUC73 518	15,56
Média	13,46

Os dados dos teores de fibra dos materiais utilizados foram utilizados para construir uma matriz de relação fenotípica, dividindo o menor teor pelo maior, obtendo as distâncias relativas entre os fenótipos. Os teores foram utilizados para construir um dendrograma pelo método de Ward, usando distância euclidiana.

Extração de DNA

Foram selecionados 15 acessos de cana-de-açúcar para extração de DNA (Tabela 2). Os genótipos foram obtidos da Estação de Floração e Cruzamentos Serra do Ouro e colocados para brotarem em caixas de dimensão 45cm x 30cm x 09cm. As folhas jovens de plantas com aproximadamente 30 dias de idade foram utilizadas para extração do DNA. O protocolo de extração foi baseado no método CTAB (Saghai-Marrof *et al.*, 1984) e a quantificação em gel de agarose a 1%.

Tabela 2. Identificação de 15 genótipos de cana-de-açúcar utilizados, com seus parentais e origem.

Genótipos	Parentais	Origem
RB835560	(H49-4566 x ?) US59-16-1 x RB72454 (CP53-76 x ?)	Republica do Brasil
TUC73-518	L66-48 x US66-569	Argentina
RB991562	(BO17 x IAC 50/134) SP80-185 x ?	Republica do Brasil
RB845286	(CP57-76 x ?) RB72454 x SP70-1143 (IAC 48/65 x ?)	Republica do Brasil
RB991511	(NCo310 x 54N7096) Q135 x RB835054 (NA56-79 x RB72454)	Republica do Brasil
SP80-4967	SP71-3079 x ?	São Paulo, Brazil
RB961	(RB72454 x B3337) RB83594 x B4362 (B37161 x POJ2878)	Republica do Brasil
RB72454	(F36-819 x CP36-46) CP53-76 x ?	Republica do Brasil
SP79-1011	(Co419 x SELF) NA56-79 x Co775 (POJ2878 x Co371)	São Paulo, Brasil
RB971765	(NA56-79 x Q47) RB8533 x RB835019 (RB72454 x NA56-79)	Republica do Brasil
RB961552	(B37161 x POJ2878) B4362 x IAC68/12 (Co419 x IAC52/179)	Republica do Brasil
RB9629	(IAC48/65 x RB705096) RB80457 x ?	Republica do Brasil
RB991532	(C278 x ?) RB75126 x RB855536 (SP70-1143 x RB72454)	Republica do Brasil
RB971754	(NCo310 x PT43-52) F150 x RB739359 (IANE55-34 x ?)	Republica do Brasil
RB971741	(H53-3989 x ?)RB825336 x RB91524 (Co6806 x RB72454)	Republica do Brasil

Desenvolvimento de marcadores moleculares microssatélites

Seqüências microssatélites contendo di-, tri- e tetra-nucleotídeos foram pesquisadas no banco de EST de cana-de-açúcar, depositado no “The Gene Index Project” (<http://compbio.dfc.harvard.edu/tgi/>), que contém mais de 255 mil seqüências. Essas análises foram feitas utilizando o software TRF (Tandem Repeats Finder) (Benson, 1999). Os principais parâmetros para a obtenção dos primers foram definidos

de acordo com as seguintes características: comprimento do primer entre 18-22 nucleotídeos, tamanho do produto de PCR entre 100-300 pb, e temperatura ideal de anelamento dos primers de 60 °C. Os *oligonucleotídeos* (chamados de SCC) foram desenhados utilizando o software *primer 3* (<http://primer3.sourceforge.net/>).

Análise de SSR

As reações de microssatélites foram preparadas para um volume de 50 µL. Contendo 50 ng de DNA genômico; Tampão da enzima; 1,5 mM de MgCl₂; 0,2 mM de dNTPs; 0,5U de *Taq*-Polimerase e 0,2 µM de cada *primer*. As amplificações foram realizadas em termociclador (modelo: PTC-100, MJ Research, Inc.). O programa utilizado para a amplificação do DNA consistiu de 94 °C por 5 min, seguidos de 35 ciclos de 94 °C por 1 min, 60 °C por 1 minuto e 72 °C por 1 minuto e uma extensão final de 72 °C por 10 minutos. O DNA de peso molecular (100pb) foi utilizado como padrão, para determinação do peso molecular dos respectivos fragmentos de DNA amplificados. Os produtos da amplificação foram separados em gel de poliacrilamida a 6% e revelados em nitrato de prata. As imagens foram capturadas utilizando sistema de fotodocumentação **Gel Logic 212 Pro**.

Análise dos dados

A análise constou da presença (1) ou ausência (0) do fragmento e a matriz foi usada para estimar as seguintes variáveis:

- 1) Número bandas polimórficas (n_p).
- 2) Número de bandas não polimórficas (n_{np}).

- 3) Probabilidade de confusão (C_j) do j th primer (Tessier, 1999): $C_j = \sum_{i=1}^I p_i \frac{(N_{p_i} - 1)}{N - 1}$,
onde p_i é a frequência do i th padrão; N : tamanho da amostra; I : número total de padrões gerados.
- 4) Poder discriminatório (D_j) do j -th primer (Tessier, 1999): $D_j = 1 - C_j$.
- 5) Conteúdo de polimorfismo (PIC) obtido através da expressão: $PIC = 1 - \sum p_i^2$,
onde p_i^2 é a frequência do alelo i elevado à segunda potência para o j th marcador (Power et al. 1996). Considerando os SSRs como dominantes, o PIC foi calculado como o limite de D_j quando N tende ao infinito: $D_L = \lim(D_j) = 1 - \sum_{i=1}^I p_i^2$
- 6) A probabilidade de identidade $P_{(ID)}$, ou probabilidade de que dois indivíduos de uma população tenham o mesmo genótipo em múltiplos *loci*, foi calculada considerando como marcadores dominantes: $P_{(ID)dom} = p^2 + (2pq)^2 + (q^2)^2$, conforme descrito por (Waits et al., 2001), onde p é a frequência da presença da banda (estágio alélico 1) e q a frequência de ausência da banda (estágio alélico 0).
- 7) A similaridade genética (GS) foi calculada utilizando coeficiente de Jaccard, obtido pela expressão: $GS = a / (a + b + c)$, onde a o número de coincidências positivas (1) em ambos genótipos, b o número negativo (0) para o genótipo i e positivo (1) para o genótipo j e c o número positivo (1) para o genótipo i e negativo (0) para o genótipo j (Reif et al., 2005). Os valores de similaridade de Jaccard foram usados para gerar um agrupamento usando o procedimento UPGMA. Essas análises foram feitas usando o *software* NTSYS 2.1.

Correlação de matriz

A matriz de relação fenotípica e a matriz de similaridade genética de Jaccard foram correlacionadas, usando o coeficiente de correlação de Mantel.

Resultados

Teor de fibra

O agrupamento de Ward usando distância euclidiana dividiu os acessos em três grupos distintos. O grupo “I” formado por três acessos: RB835560 com um teor de fibra equivalente a 10,46%, SP804967 com um teor de fibra de 10,52% e RB961 com um teor de fibra de 11,03%. O grupo “II” com acessos intermediários constituído de cinco acessos: RB961552 (13,47%), RB991532 (12,78%), RB971754 (13,10%) e RB72454 (13,03%). O grupo “III” com seis acessos: RB9629, RB971765, RB991562, RB991511, RB845286 com um teor de fibra variando de 14,37-15,57% nos acesso deste grupo (Figura 1).

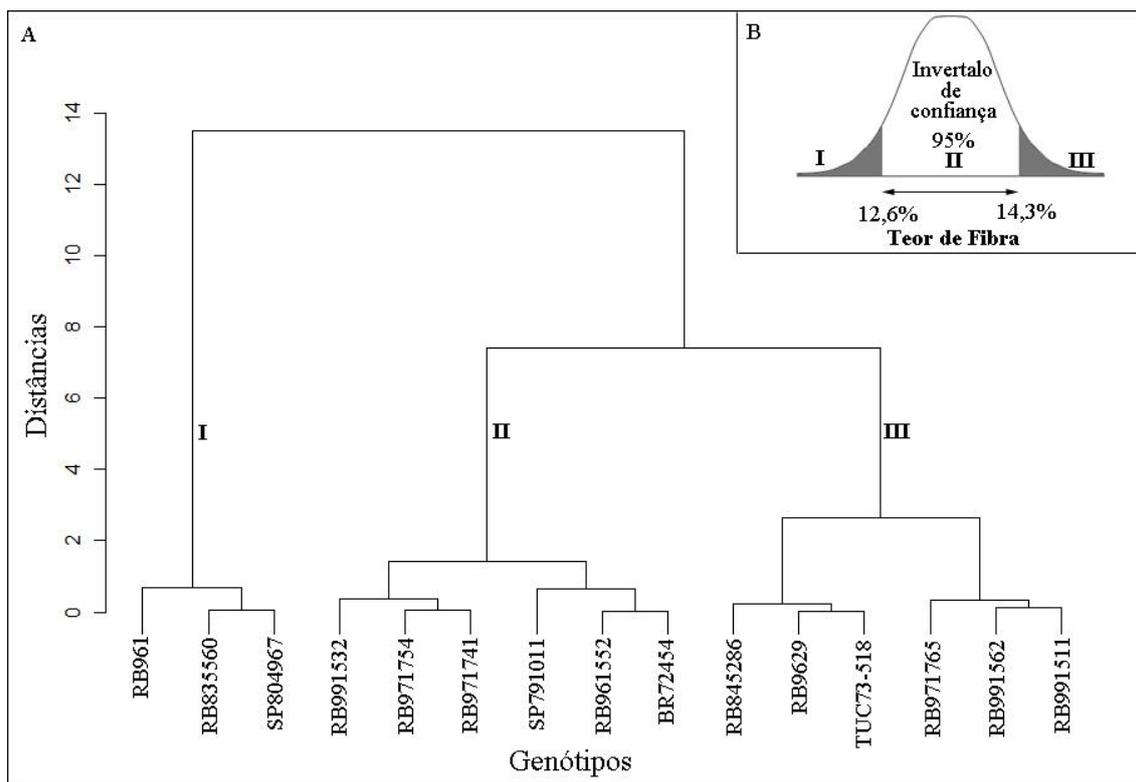


Figura 1. Dendrograma de Ward, mostrando o agrupamento das variedades para o teor de fibra (A). Intervalo de confiança para teor de fibra (B).

Diversidade genética de SSR

Dos genes expressos no colmo, foram encontrados 79 ESTs contendo sequências microssatélites. Desse total, 50 puderam ser usadas para desenhar marcadores microssatélites, usando apenas microssatélites contendo di, tri e tetranucleotídeos. Alguns fatores foram limitantes para desenhar os iniciadores, como por exemplo, os microssatélites encontravam-se no início do EST, o que poderia provocar uma grande amplificação, tendo como molde uma sequência repetitiva. A análise dos ESTs no NCBI revelou que a maioria das sequências apresentou homologia com proteínas hipotéticas, em sua maioria associada a outras espécies de Poaceae como sorgo e arroz.

Vinte e um *primers* foram selecionados por apresentarem padrões de bandas de alta qualidade e baixa amplificação inespecífica (Figura 2). Esses *primers* amplificaram um total de 167 alelos em quinze genótipos, com tamanhos alélicos variando de 135-505 pb, número de alelos alterando de 3-12 por indivíduo, mostrando a natureza poliplóide da cana-de-açúcar, o número de alelos polimórficos variou de 3-11 e o número de alelos não polimórficos foi baixo, com no máximo 2 alelos monomórficos nos *primers* SCC74, SCC81, SCC92 e SCC97, já os *primers* SCC72, SCC79, SCC87, CSS89, SCC94 e SCC96 mostraram todos os alelos polimórficos e uma amplificação inespecífica muito baixa com amplificações bem definidas e fácil análise (Tabela 2).

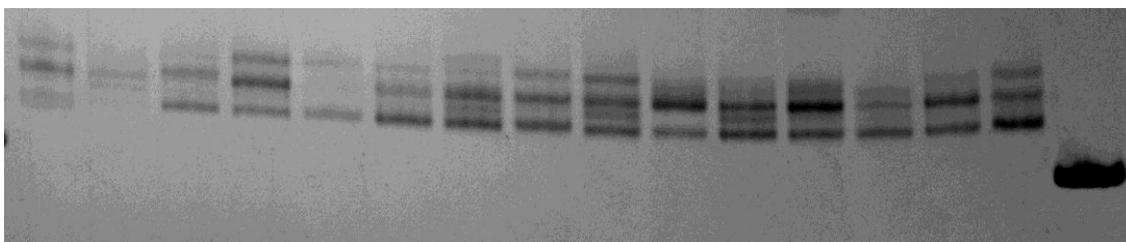


Figura 2. Perfil de eletroforese vertical em gel de acrilamida do marcador molecular SCC81 em 15 acessos de cana-de-açúcar.

O PIC médio entre os *primers* SSR foi 0,794, com o mínimo de 0,434 (SCC92) e máximo de 0,951 (SCC76). O poder discriminatório dos *primers* mostraram uma média

de 0,779 e o SCC76 apresentou um poder discriminatório máximo de 0,947. A probabilidade de confusão variou de 0,052 a 0,607 nos *primers* SCC76 e SCC92 respectivamente, com média de 0,220. A Tabela 2 mostra os iniciadores desenvolvidos para analisar a variabilidade para o teor de fibra em cana-de-açúcar.

Tabela 2. Primers de microssatélites, as probabilidades de confusão (Cj), poder discriminatório (Dj), conteúdo de polimorfismo informações (PIC), número de alelos e tamanhos alélicos.

SSR	Gen Bank nº	Motivo.	Cj	Dj	PIC	Nº Alel.	Taman. Alel.(pb)
SCC70	CA173221	TGTC	0,21	0,79	0,80	9 (1)	203 – 302
SCC71	CA173372	GA	0,15	0,85	0,86	7 (1)	135 – 179
SCC72	CA194262	TA	0,20	0,80	0,81	7 (0)	146 – 215
SCC74	CA195030	CAG	0,10	0,90	0,91	12 (2)	206 – 274
SCC76	CA195435	GA	0,05	0,95	0,95	10 (0)	195 – 233
SCC78	CA204912	TGC	0,47	0,53	0,56	4 (1)	200 – 218
SCC79	CA205041	CTC	0,14	0,86	0,87	10 (0)	177 – 217
SCC81	CA205097	GAC	0,14	0,86	0,87	12 (2)	229 – 353
SCC82	CA205346	CTC	0,13	0,87	0,88	12 (1)	231 – 505
SCC83	CA205348	CT	0,22	0,79	0,81	6 (1)	400 – 447
SCC86	CA205494	CT	0,09	0,92	0,92	7 (1)	205 – 253
SCC87	CA206830	CT	0,23	0,77	0,79	6 (0)	161 – 183
SCC89	CA207738	CCT	0,18	0,82	0,84	12 (0)	192 – 276
SCC90	CA208454	AGC	0,14	0,86	0,87	10 (1)	178 – 231
SCC92	CA210426	CT	0,61	0,39	0,43	5 (1)	205 – 234
SCC92	CA210513	ATCT	0,19	0,81	0,82	9 (2)	137 – 200
SCC93	CA210595	GCA	0,27	0,73	0,75	7 (1)	216 – 291
SCC94	CA210765	CTG	0,11	0,89	0,90	3 (0)	207 – 237
SCC96	CA213251	TGT	0,24	0,76	0,78	8 (0)	237 – 348
SCC97	CA213285	ACA	0,26	0,74	0,75	7 (2)	255 – 275
SCC98	CA213437	AGG	0,52	0,48	0,52	4 (1)	216 – 251
Média			0,22	0,78	0,79	???	239,36

A análise de similaridade genética de Jaccard mostrou uma média de 0,49 entre os 15 genótipos, com maior similaridade entre os genótipos SP791011 e RB845286 (0,61) e mínima entre os genótipos SP791011 e TUC73518 (0,38). Usando a similaridade média de Jaccard, o agrupamento dividiu os acessos em cinco grupos (Figura 3). Deve-se notar que o genótipo TUC73518 ficou em um grupo a parte, sendo esse acesso de origem Argentina.

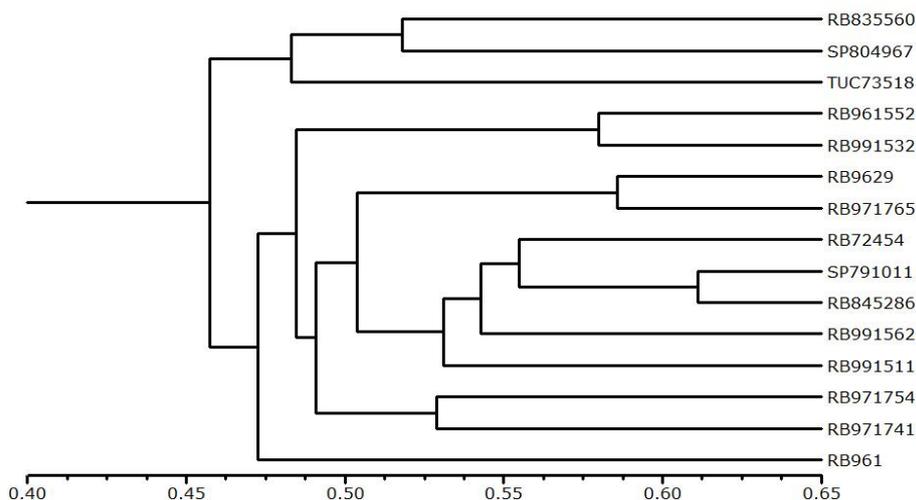


Figura 3. Dendrograma obtido pela análise de Jaccard, em acessos de cana-de-açúcar.

Análise de correlação

A correlação de Mantel entre a matriz de relação fenotípica com a similaridade de Jaccard com todos os *primers* foi 0,30. Entretanto, a correlação entre o fenótipo e cada *primer* separadamente mostrou que os primers SCC72 e SCC92 apresentaram correlações iguais a 0,37 e 0,39, respectivamente (Figura 4), sugerindo serem *primers* com elevada associação entre SSR e fenótipo e indicando que os acessos compartilham dos mesmos alelos entre os grupos. Analisando a correlação entre teor de fibra e o dois *primers* SCC72 e SCC92 mostrou uma correlação de 0,47, indicando que esses dois *primers* juntos possuem alta correlação com o fenótipo.

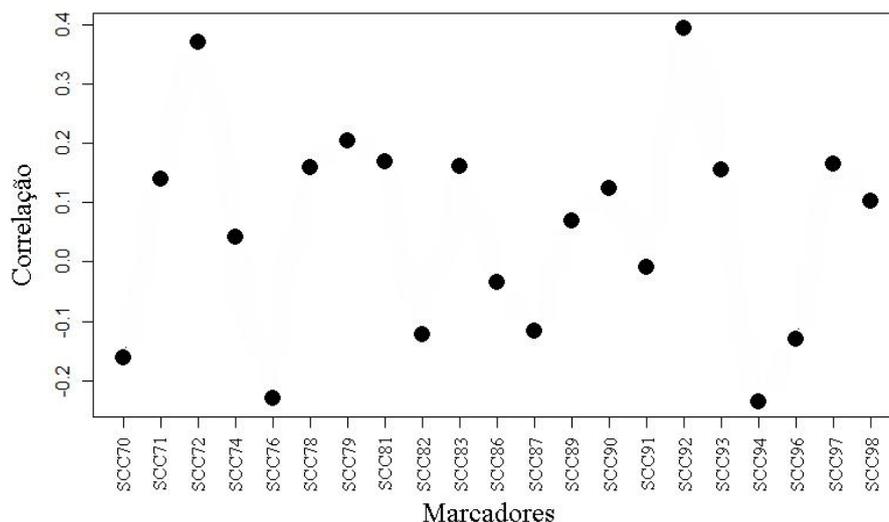


Figura 4. Correlação de Mantel com marcadores microssatélites SSR.

A análise de similaridade genética de Jaccard, usando somente os *primers* SCC72 e SCC92, mostrou uma similaridade média de 0,48, com mínima (0,25) entre os genótipos SP804967 e RB961552 e máxima (0,86) entre RB991511 e RB845286. Interessante mostrar que os genótipos com menor similaridade de Jaccard estão em grupos distintos para o teor de fibra, enquanto os com maior similaridade estão no mesmo grupo (Figura 1). Essa visualização pode ser observada no dendrograma usando similaridade de Jaccard para os marcadores SCC72 e SCC92, em que os grupos com maiores teores de fibra possuem maior similaridade genética (Figura 5).

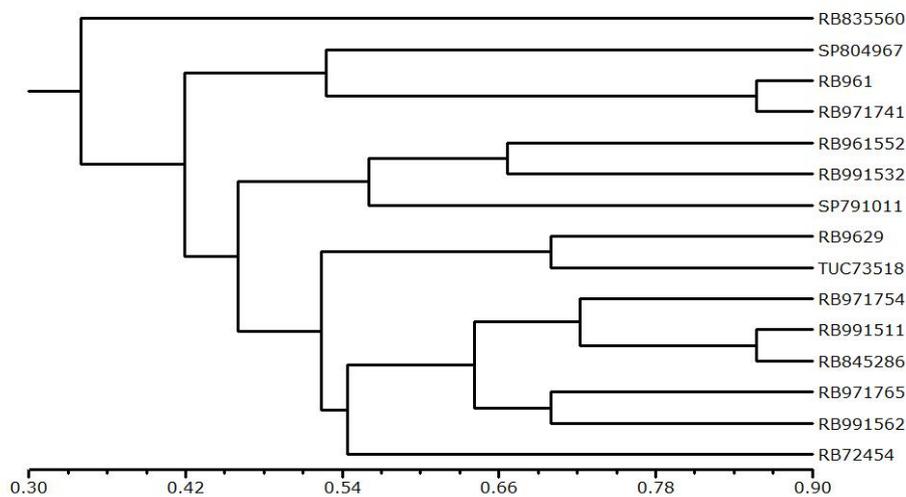


Figura 5. Dendrograma obtido pela análise de Jaccard, em acessos de cana-de-açúcar, usando os *primers* SCC72 e SCC92.

Discussão

Atualmente, o desenvolvimento de novas variedades de cana-de-açúcar está associado aos seguintes cenários: a) baixo teor de sacarose e alto teor de fibra; b) quantidade de sacarose alta e teor de fibra baixo e c) variedades com equilíbrio no teor de fibra e sacarose.

A escassez de eletricidade, somada à alta do petróleo ameaçam deter o crescimento econômico do Brasil. Nas últimas décadas, o sistema energético do país se orientou para a produção de grandes blocos de energia térmica e por esse motivo, a biomassa participa muito pouco na geração elétrica do Brasil. Somado a isto, a crescente demanda de energia e as preocupações ambientais relacionadas com a diminuição do dióxido de carbono (CO₂) na atmosfera despertaram o interesse em se encontrar soluções alternativas para os combustíveis fósseis.

A produção elevada de biomassa, com elevados teores de fibra, tem possibilitado utilizar o bagaço para co-geração de eletricidade, para isso, o desenvolvimento de variedades com elevado teor de fibra tem sido objetivo dos programas de melhoramento. Nesse sentido, determinar a diversidade genética para o teor de fibra é uma etapa de importância no melhoramento. Os resultados que nós encontramos, mostram uma ampla variabilidade genética para o teor de fibra e que essa variabilidade está associada aos dois marcadores SSR desenvolvidos. Esses marcadores podem ser utilizados para analisar a diversidade genética em bancos de germoplasmas e para seleção de plantas em estágios iniciais, diminuindo o tempo de obtenção de novas variedades.

Os marcadores utilizados nesse trabalho foram oriundos de sequências EST presentes no colmo de cana-de-açúcar, sugerindo serem genes expressos o que torna os nossos resultados mais confiáveis. Além disso, essas sequências podem ser utilizadas para transferibilidade para outras espécies, devido à sua presença nas regiões conservadas é outra vantagem importante destes marcadores.

Marcadores microssatélites moleculares têm mostrado alta eficiência na análise genética de cana de açúcar (Cordeiro *et al.*, 2001; Pinto *et al.*, 2004, 2006; Oliveira *et al.*, 2009; Duarte Filho *et al.*, 2010) tornando-se uma das ferramentas mais usadas na identificação de características genéticas dos indivíduos. Isto é comprovado pelos valores encontrados em outros estudos de cana-de-açúcar como PIC elevado (Cordeiro *et al.* 2003, Pinto *et al.*, 2004, 2006, Duarte Filho *et al.*, 2010), sugerindo marcadores moleculares como ferramenta apropriada para ser utilizada no auxílio para criação de novas variedades com características conhecidas.

A capacidade de um marcador gerar perfis genéticos únicos em acessos de cana é favorecida pela alta poliploidia, que permite a detecção de vários tipos de alelos em um único acesso (Cordeiro *et al.*, 2001; Pinto *et al.*, 2004; Maccheroni, 2009). Por outro lado, a natureza poliploide da cana-de-açúcar faz com que seja difícil obter estatísticas sobre genética de populações e torna complexa a obtenção de genótipos, sendo mais apropriado para analisar os marcadores SSR como dominante. Neste estudo, a variação no número de alelos dentro de cada indivíduo mostra que os marcadores têm grande variação, confirmando o elevado nível de ploidia.

Os altos valores de PIC e D_j nos resultados deste estudo se deve principalmente à presença de alelos exclusivos em alguns acessos, diferenciando geneticamente de outros materiais analisados. Este recurso proporciona maior diferenciação genética entre os indivíduos em uma população, pelo desenho bem definido de um perfil único ou

similar dos alelos. Essa característica dos marcadores SSR é observada em outros trabalhos como Oliveira *et al.* (2009), onde altos valores de Dj e PIC foram obtidos em 135 SSR de cana.

A associação entre as medidas de divergência genética e fenotípica foi estimada utilizando o teste de Mantel (Mantel, 1967), que compara duas matrizes, elemento por elemento. Este teste fornece ainda um valor de correlação (r), que quantifica o grau de relacionamento entre as duas matrizes.

A matrix baseada no coeficiente de Jaccard e a matrix da Distância Euclidiana Média Padronizada foram comparadas para obtenção da relação entre as diferentes técnicas de estimativas de divergência genética. Segundo Tatineni *et al.* (1996), um valor de correlação superior a 0,5 é considerado estatisticamente significativo, se o número de unidades observadas for superior a 15. Esse parâmetro de análise se encaixa em neste trabalho, pelo fato da correlação dos *primers* SCC72 e SCC92 se aproxima bastante desse valor ($r = 0,47$).

Conclusão

1. Existe diversidade genética para os loci analisados nos acessos do banco de germoplasma analisado
2. O uso de marcadores moleculares SSR em sequencias ESTs apresenta grande potencial e tem se mostrado eficiente para gerar perfil genético único em acessos de cana-de-açúcar.
3. Existe correlação uma significativa dos *primers* com os fenótipos estudados.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao programa de melhoramento genético da cana-de-açúcar (PMGCA/RIDES/UFAL) por fornecer os genótipos. A Universidade Federal de Alagoas, Campus Arapiraca (UFAL) e ao Laboratório de Recursos Genéticos da mesma instituição. A FAPEAL pela bolsa concedida.

Referências

UDOP S.A. Udop Disponível em:

<<http://www.udop.com.br/index.php?item=alcohol>> Acesso em 17 novembro 2011.

Scaramucci JA, Perin C, Pulino P, Bordoni OFJG, Cunha MP, and Cortez LAB (2006).

“Energy from sugarcane bagasse under electricity rationing in Brazil: A computable general equilibrium model”. **Energy Policy** 34 (9) 986–992.

Duarte Filho LSC, Silva PP, Santos JM, Barbosa GVS, Ramalho-Neto C E, Soares L, Andrade JCF, Almeida C (2010). Genetic similarity among genotypes of sugarcane estimated by SSR and coefficient of parentage. **Sugar Tech.** v.12, n.2, p.145-149.

Benson G (1999) Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences. **Nucleic Acids Research** 27: 573-580.

Cobill RM (2005). Evaluation of sweet sorghum as a complementary bioenergy crop to sugarcane in Louisiana. *J. Am. Soc. Sugar Cane Tech.* 26(1): 57-58.

Saghai-Marroff MA, Soliman KM, Jorgensen RA e Allard RW (1984) Ribosomal DNA Spacer-length polymorphism. **Proc Natl Acad Sci** 81: 8014-8018.

Cuadrado A, Acevedo R, Espina MSD, Jouve N, Torre C (2004) Genome remodelling in three modern *S. officinarum* x *S. spontaneum* sugarcane cultivars. **Journal of Experimental Botany** **55 (398)**: 847- 854.

Cordeiro GM, Taylor GO, Henry RJ (2001) Characterisation of microsatellite markers from sugarcane (*Saccharum* sp) a highly polyploid species. **Plant Science** **155**: 161.

Cordeiro GM, Elliott F, McIntyre CL, Casu RE, Henry RJ (2003) Characterisation of single nucleotide polymorphisms in sugarcane ESTs. **Theor Appl Genet** **113**: 331- 343.

D'Hont A, Grivet L, Feldmann P, Rao S, Berding N, Glaszmann JC (1996) Characterisation of the double genome structure of modern cultivars (*Saccharum* spp.) by molecular cytogenetics. **Molecular Gene Genetics** **250**: 405-413.

Pinto LR, Garcia AAF, Pastina MM, Teixeira LHM, Bressiani JA, Ulian EC, Bidoia MAP, Souza AP (2006) Analysis of genomic and functional RFLP derived markers associated with sucrose content fiber and yield QTLs in a sugarcane (*Saccharum* spp) commercial cross. **Euphytica** **172**: 313–327.

Jannoo N, Grivet L, Seguin M, Paulet F, Domaingue R, Rao PS, Dookun A, D'Hont A, Glaszmann JC (2004) Molecular investigation of the genetic base of sugarcane cultivars. **Theor Appl Genet** **99**: 171-184.

Oliveira ACB, Brito GG E Sakiyama NS and Borém A, Caixeta ET (2009) Tipos de Marcadores Moleculares. (2ªEdição) **Marcadores Moleculares Viçosa MG: UFV.**

Pinto LR, Oliveira KM, Ulian EC, Garcia AAF, de Souza AP (2004) Survey in the sugarcane expressed sequence tag database (SUCEST) for simple sequence repeats. **Genome** **47**: 795-804.

Waits L, Taberlet P, Swenson J, Sandegren F, Franzén R (2001) Nuclear DNA microsatellite analysis of genetic diversity and gene flow in the Scandinavian brown bear (*Ursus arctos*). **Molecular Ecology**, **9**, 421–431.

Reif JC, Hamrit S, Heckenberger M, Schipprack W, Bohn M, Melchinger AE (2005) Genetic structure and diversity of European flint maize populations determined with SSR analyzes of individuals and bulks. **Theor Appl Genet** 111:906–913

Tatineni, V.; Cantrell, R. G.; Davis, D. D (1996). Genetic diversity in elite cotton germplasm determined by morphological characteristics and RAPDs. **Crop Science**, Madison, v. 36, p. 186-192.