



**POLYANA PLACEDINO ANDRADE**

**MARCADORES MOLECULARES ASSOCIADOS  
AO TEOR DE FIBRA E DIVERGÊNCIA  
GENÉTICA EM CANA-DE-AÇÚCAR**

**LAVRAS-MG**

**2013**

**POLYANA PLACEDINO ANDRADE**

**MARCADORES MOLECULARES ASSOCIADOS AO TEOR DE FIBRA  
E DIVERGÊNCIA GENÉTICA EM CANA-DE-AÇÚCAR**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós Graduação em Agronomia/Fitotecnia, área de concentração em Produção Vegetal, para a obtenção do título de Doutora.

**Orientadora**

Dra. Luciane Vilela Resende

**Coorientador**

Dr. Luiz Antônio de Bastos Andrade

**LAVRAS - MG**

**2013**

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Coordenadoria de Produtos e  
Serviços da Biblioteca Universitária da UFLA**

Andrade, Polyana Placedino.

Marcadores moleculares associados ao teor de fibra e  
divergência genética em cana-de-açúcar / Polyana Placedino  
Andrade. – Lavras : UFLA, 2013.

92 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2013.

Orientador: Luciana Vilela Resende.

Bibliografia.

1. Proteínas relacionadas ao teor de fibra. 2. Microssatélites. 3.  
Sequências expressas. 4. *Saccharum* spp. I. Universidade Federal de  
Lavras. II. Título.

CDD – 633.6123

**POLYANA PLACEDINO ANDRADE**

**MARCADORES MOLECULARES ASSOCIADOS AO TEOR DE FIBRA  
E DIVERGÊNCIA GENÉTICA EM CANA-DE-AÇÚCAR**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós Graduação em Agronomia/Fitotecnia, área de concentração em Produção Vegetal, para a obtenção do título de Doutora.

APROVADA em 31 de julho de 2013.

Dr. Adriano Teodoro Bruzi	UFLA
Dra. Édila Vilela de Resende Von Pinho	UFLA
Dr. Ivan Antônio dos Anjos	IAC
Dr. Carlos Eduardo Pulcinelli	SOUZA CRUZ



Dra. Luciane Vilela Resende

**Orientadora**

**LAVRAS- MG**

**2013**

**OFEREÇO**

*A Deus*

**DEDICO**

*Aos meus pais, Wander e Elba*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pelas inúmeras bênçãos recebidas, por me iluminar em minhas escolhas e me direcionar ao melhor caminho;

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Departamento de Agricultura (DAG), juntamente com todos os excelentes professores e funcionários aos quais tive o privilégio de conviver, pela oportunidade de realização da formação acadêmica e, principalmente, pela formação como ser humano;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela concessão da bolsa de estudos;

Aos professores e pesquisadores da banca examinadora, pela colaboração nessa jornada;

À minha mãe Elba, por todos os ensinamentos e amor incondicional;

Ao meu pai Wander, pelo exemplo de vida e profissional, grande sabedoria, confiança e por me apoiar sempre em minhas decisões;

À minha irmã Michele, pela paciência, amizade, afeto e companheirismo;

À madrinha Elza Maria, pela preocupação, incentivo e orações;

À minha orientadora e amiga Prof. Luciane Vilela Resende, pelos ensinamentos, paciência, compreensão e disponibilidade;

Ao meu coorientador Prof. Luiz Antônio de Bastos Andrade, Tio Tonho, pela paciência, exemplo, dedicação, credibilidade, carinho e por acreditar em minha capacidade;

Aos demais agrônomos da família, Tio Messias, Tio Zé Marcos e Tio Beto, pelo exemplo e torcida;

Aos meus avós, Vó Wilma e Vô Romeu pelos ensinamentos de vida;

Ao Laboratório de Genética e todos os que lá trabalham, em especial ao Lamartine, por me receber tão bem, pelos ensinamentos, atenção, paciência e ajuda em meu experimento;

Ao professor Márcio Barbosa da UFV (Universidade Federal de Viçosa) e Pedro Vidigal pela disponibilidade e ajuda na busca de dados, sem os quais não seria possível a realização deste trabalho;

À amiga e colega de trabalho Juliana pela paciência, descontração e ajuda nas análises;

Às minhas queridas amigas de Perdões, que mesmo distantes, sempre se fazem tão presentes;

Aos amigos da pós-graduação por compartilharem dos mesmos medos e anseios;

A todos os colegas da área de cana-de-açúcar, NECANA, pela parceria, convívio, descontração e por apostarem em mim;

Aos colegas e amigos de curso;

Aos amigos e amigas que me incentivaram na busca da concretização de meus sonhos;

À minha família e todos que direta ou indiretamente contribuíram para a concretização deste trabalho.

## RESUMO GERAL

No Brasil, nos programas de melhoramento de instituições de pesquisa de cana-de-açúcar buscam-se cultivares de *Saccharum* spp. com características específicas para cada setor, como a indústria para produção de álcool e açúcar, cultivares para bioenergia, forrageiras e também para produção de cachaça artesanal, onde teor de fibra se torna uma característica relevante. O entendimento dos componentes relacionados a esta característica representa um grande avanço na seleção de materiais para este nicho da cadeia produtiva da cana-de-açúcar. Objetivou-se com esta pesquisa, buscar em bancos de dados, seqüências expressas de proteínas que estejam relacionadas aos teores de fibra em cana-de-açúcar, bem como caracterizar genótipos de *Saccharum* spp., utilizando marcadores moleculares do tipo SSR. Neste sentido foram usados 11 *primers*, os quais foram desenhados a partir de EST (*expression sequence tag*) do genoma da cana-de-açúcar, que foram testados em 21 cultivares e 2 espécies de cana-de-açúcar. Nenhum dos marcadores das proteínas analisadas puderam ser usados como um padrão para identificação de teor de fibra na cana-de-açúcar. Para a caracterização, foram utilizados 13 *primers* em 21 cultivares e 2 espécies de cana-de-açúcar. Pelo dendrograma obtido, foi observada a dissimilaridade entre as cultivares, caracterizando-as por meio dos *primers* utilizados. Foi possível detectar polimorfismo, o que permitiu estimar genótipos mais divergentes existentes no material estudado.

**Palavras-chave:** Proteínas relacionadas ao teor de fibra. Microssatélites. Seqüências expressas. *Saccharum* spp.

## GENERAL ABSTRACT

In Brazilian improvement programs of sugar cane research institutions, *Saccharum* spp. cultivars with specific characteristics for each sector are sought, such as the industry for the production of alcohol and sugar, cultivars for bioenergy, fodder and also for the production of handmade cachaça, where the fiber content becomes a relevant characteristic. Understanding the components related to this characteristic represents a major advance in material selection for this niche of the sugar cane commodity chain. The objective of this research was to seek, in databases, expressed sequences of protein that are related to fiber contents in sugar cane, as well as characterize *Saccharum* spp. genotypes, using SSR molecular markers. In this context, 11 primers were used; they were designed from the EST (expression sequence tag) of the sugar cane genome, which were tested in 21 cultivars and 2 species of sugar cane. None of the markers of the analyzed proteins could be used as a standard for the identification of the fiber content in sugar cane. For the characterization, 13 primers in 21 cultivars and 2 species of sugar cane were used. By the obtained dendrogram, a dissimilarity was observed among cultivars, characterizing them through the used primers. It was possible to detect polymorphism, which allowed to estimate more divergent genotypes existing in the studied material.

**Keywords:** Protein related to fiber content. Microsatellites. Expressed sequences. *Saccharum* spp.

## LISTA DE FIGURAS

### CAPITULO 2

Figura 1	Dendrograma gerado pelo método UPGMA por meio da matriz de dissimilaridade de Jaccard, por <i>primers</i> SSR, entre acessos de <i>Saccharum</i> spp.....	57
Figura 2	Dendrograma com as divisões dos grupos gerado pelo método UPGMA por meio da matriz de dissimilaridade de Jaccard, por <i>primers</i> SSR, entre acessos da coleção da UFPA.....	59
Figura 3	Polimorfismo genético em genótipos de cana-de-açúcar utilizando o <i>primer</i> ALFAGALAC1. 1 a 23 genótipos avaliados (1) CTC1; 2) CTC2; 3) CTC7; 4) CTC8; 5) CTC9; 6) CTC14; 7) CTC15; 8) CTC16; 9) RB925345; 10) RB861515; 11) RB935744; 12) RB855453; 13) RB835486; 14) RB925211; 15) SP81-3250; 16) SP80-1842; 17) RB72454; 18) SP83-2847; 19) SP89-1115; 20) SP84-2025; 21) SP91-1285; 22) <i>S. officinarum</i> e 23) <i>S. spontaneum</i> ). M-marcador molecular (100bp).....	60
Figura 4	Polimorfismo genético em genótipos de cana-de-açúcar utilizando o <i>primer</i> ALFAGALAC02. 1 a 23 genótipos avaliados (1) CTC1; 2) CTC2; 3) CTC7; 4) CTC8; 5) CTC9; 6) CTC14; 7) CTC15; 8) CTC16; 9) RB925345; 10) RB861515; 11) RB935744; 12) RB855453; 13) RB835486; 14) RB925211; 15) SP81-3250; 16) SP80-1842; 17) RB72454; 18) SP83-2847; 19) SP89-1115; 20) SP84-2025; 21) SP91-1285; 22) <i>S. officinarum</i> e 23) <i>S. spontaneum</i> ). M- marcador molecular (100bp).....	61
Figura 5	Polimorfismo genético em genótipos de cana-de-açúcar utilizando o <i>primer</i> ENDO1. 1 a 23 genótipos avaliados (1) CTC1; 2) CTC2; 3) CTC7; 4) CTC8; 5) CTC9; 6) CTC14; 7) CTC15; 8) CTC16; 9) RB925345; 10) RB861515; 11) RB935744; 12) RB855453; 13) RB835486; 14) RB925211; 15) SP81-3250; 16) SP80-1842; 17) RB72454; 18) SP83-2847; 19) SP89-1115; 20) SP84-2025; 21) SP91-1285; 22) <i>S. officinarum</i> e 23) <i>S. spontaneum</i> ). M- marcador molecular (100bp).....	62

Figura 6	Polimorfismo genético em genótipos de cana-de-açúcar utilizando o <i>primer</i> LACC02. 1 a 23 genótipos avaliados (1) CTC1; 2) CTC2; 3) CTC7; 4) CTC8; 5) CTC9; 6) CTC14; 7) CTC15; 8) CTC16; 9) RB925345; 10) RB861515; 11) B935744; 12) RB855453; 13) RB835486; 14) RB925211; 15) SP81-3250; 16) SP80-1842; 17) RB72454; 18) SP83-2847; 19) SP89-1115; 20) SP84-2025; 21) SP91-1285; 22) <i>S. officinarum</i> e 23) <i>S. spontaneum</i> ). M- marcador molecular (100bp).....	63
Figura 7	Polimorfismo genético em genótipos de cana-de-açúcar utilizando o <i>primer</i> GLYCOSIL01. 1 a 23 genótipos avaliados (1) CTC1; 2) CTC2; 3) CTC7; 4) CTC8; 5) CTC9; 6) CTC14; 7) CTC15; 8) CTC16; 9) RB925345; 10) RB861515; 11) RB935744; 12) RB855453; 13) RB835486; 14) RB925211; 15) SP81-3250; 16) SP80-1842; 17) RB72454; 18) SP83-2847; 19) SP89-1115; 20) SP84-2025; 21) SP91-1285; 22) <i>S. officinarum</i> e 23) <i>S. spontaneum</i> ). M- marcador molecular (100bp).....	64
CAPITULO 3		
Figura 1	Dendrograma gerado pelo método UPGMA por meio da matriz de dissimilaridade de Jaccard, por <i>primers</i> SSR, entre acessos de <i>Saccharum</i> spp.....	81
Figura 2	Dendrograma com as divisões dos grupos gerado pelo método UPGMA por meio da matriz de dissimilaridade de Jaccard, por <i>primers</i> SSR, entre acessos da coleção da UFLA.....	86
Figura 3	Detecção de polimorfismo genético em genótipos de cana-de-açúcar por meio de marcador microssatélite SCB07. 1 a 23 genótipos avaliados (1) CTC1; 2) CTC2; 3) CTC7; 4) CTC8; 5) CTC9; 6) CTC14; 7) CTC15; 8) CTC16; 9) RB925345; 10) RB861515; 11) RB935744; 12) RB855453; 13) RB835486; 14) RB925211; 15) SP81-3250; 16) SP80-1842; 17) RB72454; 18) SP83-2847; 19) SP89-1115; 20) SP84-2025; 21) SP91-1285; 22) <i>S. officinarum</i> e 23) <i>S. spontaneum</i> ).....	92

## LISTA DE TABELAS

### CAPITULO 2

Tabela 1	Marcadores moleculares, com suas respectivas sequências e temperaturas de anelamento, utilizados na análise molecular em genótipos de cana-de-açúcar.....	51
Tabela 2	Classificação dos teores de fibra das cultivares utilizadas (1 a 23 cultivares).....	52

### CAPITULO 3

Tabela 1	Identificação das 23 cultivares de cana-de-açúcar quanto aos genitores e procedência. UFLA, Lavras, MG.....	74
Tabela 2	Sequência (5'-3') dos locos microssatélites de <i>Saccharum</i> spp.....	76

## SUMÁRIO

	<b>CAPÍTULO 1 INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	14
1	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	15
2	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	18
2.1	<b>Origem e variabilidade do gênero <i>Saccharum</i>.....</b>	18
2.2	<b>Melhoramento genético da cana-de-açúcar.....</b>	19
2.3	<b>Cana-de-açúcar para a produção de cachaça de alambique.....</b>	22
2.4	<b>Características da fibra da cana-de-açúcar.....</b>	24
2.5	<b>Proteínas relacionadas ao teor de fibra.....</b>	26
2.6	<b>Marcadores moleculares.....</b>	33
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	37
	<b>CAPÍTULO 2 MARCADORES DE DNA ASSOCIADOS AO TEOR DE FIBRA EM <i>SACCHARUM</i> spp.....</b>	44
1	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	47
2	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	50
2.1	<b>Seleção das sequências.....</b>	50
2.2	<b>Desenho dos <i>primers</i>.....</b>	50
2.3	<b>Material vegetal.....</b>	51
2.4	<b>Extração do DNA.....</b>	53
2.5	<b>Reações de PCR.....</b>	54
2.6	<b>Análise.....</b>	54
3	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	56
3.1	<b>Desenho dos <i>primers</i>.....</b>	56
3.2	<b>Amplificação dos fragmentos.....</b>	56
4	<b>CONCLUSÃO.....</b>	65
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	66
	<b>CAPÍTULO 3 DIVERGÊNCIA GENÉTICA DE <i>SACCHARUM</i> spp. POR MEIO DE MARCADORES SSR.....</b>	69
1	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	72
2	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	74
2.1	<b>Material vegetal.....</b>	74
2.2	<b>Marcadores SSR.....</b>	75
2.3	<b>Extração do DNA.....</b>	76
2.4	<b>Reações de PCR.....</b>	77
2.5	<b>Análise dos locos SSR.....</b>	78
3	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	80
4	<b>CONCLUSÃO.....</b>	87
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	88

<b>ANEXOS.....</b>	<b>92</b>
--------------------	-----------

## **CAPÍTULO 1**

### **INTRODUÇÃO GERAL**

## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor mundial de cana e de açúcar e o segundo produtor mundial de etanol, sendo também o maior exportador mundial de açúcar e etanol. De acordo com o Agriannual (2013), na safra de 2012/13, a produção brasileira de cana-de-açúcar para a produção de açúcar e etanol foi de 596, 63 milhões de toneladas. No ano de 2012, a área colhida foi de 9, 68 milhões de hectare, com previsão para a safra de 2012/2013 de uma produção total de álcool etílico de 23, 49 bilhões de L e 779.862.000 sacas de 50 kg para produção de açúcar (AGRIANUAL, 2013).

A cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) ocupa papel de destaque no cenário econômico e social, principalmente na geração de divisas, por ser, até então, a principal fonte alternativa para a agroenergia, além da utilização intensiva de mão-de-obra direta e indireta.

Para se obter sucesso na produção de açúcar, etanol e outros subprodutos, é necessário que a produção de matéria-prima de cana-de-açúcar seja de qualidade. Nesse contexto, as cultivares assumem papel importante a fim de se garantir lucratividade e produtividade. Dentre os produtos da cana-de-açúcar, encontra-se a cachaça, que é a terceira bebida destilada mais consumida no mundo e a primeira no Brasil. Segundo o Programa Brasileiro de Desenvolvimento da Aguardente de Cana, Caninha ou Cachaça (PBDAC), a produção é em torno de 1,3 bilhão de litros por ano, sendo que cerca de 75% desse total é proveniente da fabricação industrial e 25%, da forma artesanal. O Brasil consome quase toda a produção de cachaça; por volta de 1% a 2 %, apenas, é exportado (2,5 milhões de litros) e os principais países compradores são Alemanha, Paraguai, Itália, Uruguai e Portugal. A produção de cachaça artesanal ou de alambique está concentrada nos Estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro, Bahia e São Paulo, sendo que os estados mineiro e fluminense

contribuem com quase 50% de toda a produção de cachaça de alambique do Brasil. Em lojas especializadas, a cachaça artesanal é vendida a preços muito altos, dependendo da marca, ou seja, o valor agregado na produção artesanal é muito elevado, já que o consumidor adquire um produto praticamente exclusivo (AGEITEC, 2007).

Atualmente, no Brasil existem quatro programas de melhoramento genético de cana-de-açúcar, a saber: Programa de Melhoramento do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC); Centro de Tecnologia Canavieira (CTC), anteriormente desenvolvido pela Cooperativa dos Produtores de Cana-de-açúcar e Álcool do Estado de São Paulo (Coopersucar) e a RIDESA (Rede Interuniversitária para Desenvolvimento do Setor Sucroalcooleiro). Mais recentemente foi criado o programa Canavialis, que surgiu em 2004 (BARBOSA et al., 2007).

Pelo fato de a cana-de-açúcar ser uma cultura perene e pelo fato do fenótipo ser uma interação entre o genótipo e o ambiente, o período para o desenvolvimento de novas cultivares é muito longo e o uso da biotecnologia pode auxiliar nisso, reduzindo o tempo de obtenção das mesmas e, neste contexto, o uso de marcadores moleculares estáveis podem auxiliar nos processos de seleção assistida.

Atualmente, um método utilizado para o desenvolvimento de marcadores moleculares é a análise de seqüências dos bancos de dados de DNA. Um desses bancos é o SUCEST, que possui fragmentos de seqüências expressas do genoma da cana-de-açúcar. Por meio de recursos computacionais, é possível identificar seqüências de DNA que funcionam como *primers* para detecção de características de interesse, como, por exemplo, o teor de fibra.

Para a produção de cachaça artesanal, certas características se fazem necessárias, sendo o teor de fibra menor uma das principais, já que esta característica permite maior extração do caldo, visto o uso de moendas simples

nesse processo. Assim, o estudo de determinadas proteínas que participam da composição da fibra se torna importante para a detecção de cultivares que apresentem os teores de fibra indicados durante o processo de seleção.

Também na seleção de cultivares superiores que possam ser usadas como genitores elite é fundamental estimar a divergência genética entre elas, além da média e variância, para que por meio dos cruzamentos realizados aumente-se a possibilidade de obtenção de indivíduos geneticamente superiores, que reúnam maior número de alelos favoráveis relacionados a produtividade.

Objetivou-se com esta pesquisa, buscar em bancos de dados, seqüências expressas de proteínas que estejam relacionados aos teores de fibra em cana-de-açúcar, bem como caracterizar genótipos de *Saccharum* spp., utilizando marcadores moleculares do tipo SSR.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) não é nativa do Brasil, mas se adaptou muito bem às condições climáticas. Lineu foi o primeiro a classificá-la, dando nome ao gênero *Saccharum* (sacarose em latim).

### 2.1 Origem e variabilidade do gênero *Saccharum*

Existem trinta e duas espécies de cana conhecidas e catalogadas, sendo cinco as mais importantes e usadas no melhoramento genético por possuírem características importantes (LANDELL; BRESSIANI, 2010), quais sejam:

- *Saccharum officinarum* L. (“fábrica de açúcar”) - Características: alta riqueza em sacarose, é a mais macia, possui baixo teor de fibra, muito suscetível a pragas e doenças e muito exigente em fertilidade do solo;
- *Saccharum spontaneum* L. – Características: resistência a doenças, pouco exigente em solo, pobre em açúcar e teor de fibra muito alto;
- *Saccharum sinensis* R. - Características: grande desenvolvimento radicular, médio teor de sacarose e médio teor de fibra.
- *Saccharum barberi* J. – Características: maior tolerância a baixas temperaturas, baixo teor de sacarose e alto teor de fibra;
- *Saccharum robustum* J. – Características: boa adaptação a solos mais úmidos, baixo teor de sacarose e alto teor de fibra;
- *Saccharum edule* H. – se destaca porque sua inflorescência é usada na alimentação humana em Nova Guiné, não sendo utilizada nos programas de melhoramento.

Toda cultivar atualmente plantada em escala comercial são híbridos interespecíficos (*Saccharum* spp.).

Acredita-se que para as espécies *S. officinarum*, *S. robustum* e *S. edule* o centro de origem seja a Oceania (região de Nova Guiné); para as espécies *S. spontaneum* e *S. barberi* o centro de origem seja a Ásia (região da Índia) e para a espécie *S. sinense* o centro de origem seja a Ásia (região da China) (LANDELL; BRESSIANI, 2010).

O desenvolvimento de cultivares destinadas a cada setor em particular, seja ele para a produção de açúcar e álcool, para cachaça de alambique, para produção de biomassa, bem como para a forragicultura, tem sido um diferencial para o aumento da produção nas lavouras em diferentes regiões do país.

De acordo com Agriannual (2013), recomenda-se a adoção do manejo de cultivares para aumentar a produtividade média dos canaviais, afirmando que a locação adequada permite aumentar o rendimento agrícola em até 40%.

## **2.2 Melhoramento genético da cana-de-açúcar**

A cana-de-açúcar foi introduzida no Brasil no início do século XVI, introduzindo-se cultivares de *S. officinarum*, denominadas canas nobres. Assim, a primeira fase da cultura da cana no Brasil compreendeu o início do período colonial até meados do século XVIII.

Por volta de 1850, ocorreu uma epidemia de gomose, doença causada por bactéria. Novamente enormes prejuízos na produção ocorreram para a indústria de açúcar no mundo. Essas epidemias levaram à necessidade de buscar novas opções de cultivares. Com isso, surgiram os primeiros programas de melhoramento de cana-de-açúcar em Java e Barbados (SILVA et al., 2007).

Basicamente nestes programas são desenvolvidos híbridos interespecíficos, principalmente entre *S. officinarum* e *S. spontaneum*, por meio

de um processo denominado nobilitação. Estes híbridos (*Saccharum* spp.) foram introduzidos no Brasil no início deste século, dando início a uma nova fase da cultura, substituindo as cultivares Caiana, Cristalina, Listada, Roxa, Rosa e Manteiga (LANDELL; BRESSIANI, 2010).

Atualmente, são quatro os programas de melhoramento de cana-de-açúcar no Brasil: o da RIDESA (Rede Interuniversitária para Desenvolvimento do Setor Sucroalcooleiro) que é o maior programa de melhoramento genético de cana no Brasil, produzindo as variedades de sigla RB e com estação de cruzamento de cana localizada em Serra do Ouro-AL; o CTC (Centro de Tecnologia Canavieira), ex COOPERSUCAR, produzindo atualmente as variedades de sigla CTC e com estação de cruzamento em Camamú- BA; o IAC (Instituto Agrônomo de Campinas), produzindo as variedades IAC e estação de cruzamento em Serra Grande-BA; e a CANAVIALIS, empresa privada do grupo Monsanto, com as variedades CV, com estação de hibridação em Maceió-AL (BARBOSA; SILVEIRA, 2010).

Os centros se localizam no litoral, pois ali encontram-se as melhores condições para a viabilidade do grão de pólen durante o período de florescimento, que no Brasil vai de maio a julho. Neste período, nestas regiões há pequenas diferenças entre temperaturas diurnas e noturnas, temperaturas sempre superiores a 15°C, alta umidade relativa e alta insolação (proximidade com o mar), luminosidade e fotoperíodo adequados, entre outras características.

Do ponto de vista agrônomo, a ocorrência do florescimento é prejudicial e indesejável, pois acarreta deslocamento de energia que estava armazenada no colmo em forma de sacarose para a inflorescência. Outro aspecto refere-se ao fenômeno do chochamento ou “isoporização”, que na maioria das vezes está relacionado com o florescimento (secamento do interior do colmo pelo secamento das células parenquimatosas) (BARBOSA; SILVEIRA, 2010).

Existem dois métodos básicos de melhoramento para a cana-de-açúcar - introdução e a hibridação. A introdução consiste em trazer cultivares obtidas de outros países; em seguida esse material passa por fase de quarentena, é estudado e comparado com os melhores híbridos nacionais para ver se há superioridade. Um exemplo é a variedade NA 56-79 que foi obtida na Argentina e se adaptou bem em condições brasileiras, não sendo mais plantada por ser suscetível ao carvão e à ferrugem. A introdução hoje é feita para melhorar os bancos de germoplasma dos programas de melhoramento. Já a hibridação consiste no cruzamento entre materiais genéticos diferentes, se dividindo em dois tipos principais: o cruzamento bi-parental (presença de um macho e uma fêmea) e o policruzamento (vários machos e fêmeas cruzando livremente), o que proporciona maior variabilidade. No cruzamento biparental atuam como fêmeas as linhagens macho-estéreis que existem na natureza (não liberam pólen porque suas anteras não se abrem) ou aquelas em que se faz a emasculação. Nesta última mergulha-se as panículas em água quente a 50°C por 5 minutos para inviabilizar o grão de pólen (BARBOSA; SILVEIRA, 2010).

Segundo estes mesmos autores, a cultivar é a tecnologia mais importante e de menor custo para o produtor. É a base que sustenta todas as demais tecnologias de produção, assumindo papel decisivo para o sucesso do empreendimento. É importante ressaltar que cultivares melhoradas são as tecnologias que mais contribuíram para os ganhos de produção e produtividade verificados nos últimos 40 anos. Dentre as cultivares mais plantadas no Brasil, atualmente a RB867515 é uma das mais relevantes para a produção, tanto para açúcar e álcool, quanto para a produção de forragem.

Assim, a variabilidade genética disponível para seleção provém de cruzamentos realizados entre genitores de interesse. Estabelecer quais genitores deverão ser cruzados é uma das etapas mais importantes de um programa de melhoramento.

O programa de desenvolvimento de novas cultivares de cana-de-açúcar é por natureza essencialmente de longa duração. Normalmente o lançamento de novos materiais tem ocorrido após cerca de 13 anos de inúmeras avaliações dos clones por meio de experimentos, observando-se a reação às doenças e pragas, longevidade, riqueza e a produtividade dos mesmos em diferentes ambientes de produção.

### **2.3 Cana-de-açúcar para a produção de cachaça de alambique**

Cachaça é a denominação típica e exclusiva da aguardente de cana produzida no Brasil, com graduação alcoólica de trinta e oito a quarenta e oito por cento em volume, a vinte graus Celsius, obtida pela destilação do mosto fermentado de cana-de-açúcar com características sensoriais peculiares, podendo ser adicionada de açúcares até seis gramas por litro, expressos em sacarose (SEBRAE, 2006).

O reconhecimento da cachaça como bebida destilada do Brasil teve início em 1982 com o diagnóstico feito pelo Instituto de Desenvolvimento Integrado de Minas Gerais (INDI), que fez com que os produtores atentassem para o grande potencial econômico e social da cachaça de alambique e a grande necessidade de organizar o setor. Nesse sentido, em 1988, foi criada a Associação Mineira dos Produtores de Aguardente de Qualidade (Ampaq), empenhando-se na divulgação e sua valorização, criando também o selo Ampaq que deu grande impulso e credibilidade à cachaça mineira. Já em 1992 foi criado o Programa Mineiro de Incentivo à Produção de Aguardente (Pró-cachaça) (MINAS GERAIS, 1992).

A produção de cachaça de alambique em Minas Gerais tem importante papel na economia do Estado, gerando renda anual estimada de 1,5 bilhões de reais e empregando direta e indiretamente cerca de 240 mil pessoas, sendo 8.466

estabelecimentos produtores, com produção de 230 milhões de litros/safra, representando 18% da produção nacional de aguardentes (SEBRAE, 2002).

Merece destaque, na atualidade, um novo grupo de consumidores de cachaça, os consumidores das classes sócio-econômicas média e alta, motivados pela melhoria da qualidade da bebida e pelas ações promocionais realizadas, principalmente, pelas associações de produtores, destacando-se a Feira / Festival Nacional da Cachaça, realizada anualmente em Belo Horizonte. Outra ação de impacto é a divulgação da marca Cachaça de Minas nos mercados mundiais, notadamente na Europa.

A cachaça mineira é um produto tipicamente rural. Os alambiques, espalhados pelo estado, estão localizados em propriedades rurais, utilizando a cana-de-açúcar por elas produzida. Segundo pesquisa realizada pelo SEBRAE - MG, 95,5% dos estabelecimentos entrevistados utilizam cana-de-açúcar produzida na propriedade, 38,6% usam mão-de-obra familiar e / ou 82,2 % usam mão-de-obra contratada. O porte do alambique e o volume de produção estão limitados aos recursos disponíveis na propriedade.

Porém, o sucesso da atividade precisa atender toda a cadeia produtiva, com importante destaque para a produção de matéria-prima de qualidade, sendo a cultivar a tecnologia mais importante e de menor custo para o produtor.

Atualmente, nos programas de melhoramento da cana-de-açúcar são desenvolvidas novas cultivares que ampliam a produtividade de energia (açúcar, álcool e fibra), atendendo às usinas sucroalcooleiras que buscam maior eficiência e rentabilidade, mas não atendendo satisfatoriamente ao produtor de cachaça de alambique.

Por meio de estudos de melhoramento genético seria difícil reunir em uma só cultivar todas as características desejáveis para o fornecimento de matéria-prima para a produção de cachaça. Contudo, certas características fazem-se necessárias como o máximo de produtividade em colmo e sacarose,

rápido desenvolvimento inicial, bom fechamento das entrelinhas, boa brotação de soqueira, colmos com diâmetro médio e uniforme, despalha espontânea ou fácil, ausência de joçal e principalmente o teor de fibra mais baixo. Essa última característica permite maior extração do caldo pelas moendas simples, situação que se diferencia da indústria e das seleções de variedades para a produção de açúcar e álcool, pois no próprio processo de seleção, durante o melhoramento, as cultivares com menor teor de fibra não são visadas.

Dessa forma, para muitas características ainda não existem informações sobre número, posição cromossômica e efeito e interações dos locos que controlam sua expressão (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Cultivares provenientes da engenharia genética são ainda um desafio para os programas de melhoramento da cana-de-açúcar, mas representam uma grande oportunidade para obtenção de caracteres de interesse para cada setor, além de redução do impacto ambiental.

#### **2.4 Características da fibra da cana-de-açúcar**

O colmo responde por mais de 80% do total de matéria seca da cana-de-açúcar madura, sendo assim é de se esperar que a qualidade do colmo influencie mais a qualidade da planta inteira do que as folhas. De acordo com Carvalho et al. (2010), os resultados obtidos na planta inteira se aproximaram mais dos valores encontrados para o colmo, evidenciando a importância dos valores desta fração em programas de melhoramento genético da cana-de-açúcar.

O bagaço é um material lignocelulósico que consiste de feixes de fibras e outras estruturas elementares como, vasos do parênquima e células epiteliais. Sua composição média é de 50% de umidade, 2% de Brix (sólidos solúveis em água), 46% de fibra (32 – 50% de celulose, 19 – 25% de hemicelulose e 23-32% de lignina) e 2% de cinzas (PANDEY et al., 2000).

Materiais lignocelulósicos na forma de biomassa de plantas, como o bagaço de cana-de-açúcar, são os mais abundantes complexos orgânicos de carbono e são constituídos, principalmente, de três componentes: celulose, hemicelulose e lignina.

A lignina, um dos principais componentes presente no bagaço de cana-de-açúcar é um polímero derivado de grupos fenilpropanóides, repetidos de forma irregular. Esses grupos que constituem a lignina são altamente condensados e muito resistentes à degradação. A lignina é o mais importante componente não-carboidratado da biomassa lignocelulósica, sendo depositada na rede de carboidratos da parede celular secundária das plantas, durante o seu crescimento (HENDRIKS; ZEEMAN, 2009). Juntamente com a celulose e a hemicelulose, a lignina é um dos principais constituintes da planta, sendo responsável pela sua resistência. Ela ocorre na parede celular de plantas superiores em diferentes composições, como, por exemplo em madeiras duras, de 25 a 35%; em madeiras macias, de 18 a 25% e em gramíneas, de 10 a 30% (LARS et al., 2000).

Basicamente, a celulose é o biopolímero mais abundante em ambiente terrestre e compõe um esqueleto que é formado por substâncias estruturais (hemicelulose) e envoltórias (lignina), que estão fortemente associadas e ligadas covalentemente (FENGEL; WEGENER, 1989). As moléculas de hemicelulose estão quase paralelas as fibrilas de celulose, enquanto a lignina apresenta-se de forma aleatória, conferindo maior estabilidade à parede.

Do ponto de vista econômico, a presença de altos teores de ligninas em vegetais representa maior custo de produção ou baixa produtividade, em alguns setores. Na obtenção da polpa de celulose e papel a partir da madeira, por exemplo, a lignina deve ser removida por meio de um tratamento químico severo, que é oneroso tanto em termos financeiros quanto ambientais. Na

pecuária, os altos teores de ligninas em plantas forrageiras determinam baixa digestibilidade, caracterizando pastagens de baixa qualidade.

Assim também, a presença de altos teores de lignina em cultivares de cana-de-açúcar destinadas à produção artesanal de cachaça pode representar menor produção da mesma.

## **2.5 Proteínas relacionadas ao teor de fibra**

Ligninas são compostos fenólicos encontrados nas paredes secundárias do sistema vascular vegetal e desempenham importantes papéis biológicos, reduzindo a permeabilidade da parede celular em relação à água, estando também envolvidas em mecanismos de defesa contra patógenos. Respondendo por 25 a 30% da biomassa terrestre, as ligninas representam o segundo mais abundante biopolímero do planeta, sendo superadas apenas pela celulose. Dessa forma, a lignificação é um processo altamente regulado decorrente da biossíntese das ligninas.

Funcionalmente, a rigidez e a hidrofobia dos polímeros de lignina são importantes para o suporte mecânico, característica que provavelmente permitiu a melhor adaptação das plantas à vida terrestre (MONTIES, 1989), a condução de água (NORTHCOTE, 1989) e a defesa vegetal ao ataque de patógenos (VANCE; KIRK; SHERWOOD, 1980). Além disso, as ligninas parecem exercer um importante papel na ancoragem e sustentação de polissacarídeos da parede celular durante a deposição dos mesmos.

A lignificação é um processo bioquímico que abrange a biossíntese de monolignóis, seu transporte e a polimerização na parede celular, que em primeiro estágio é altamente mediado por enzimas intrínsecas à formação dos precursores nos compartimentos citoplasmáticos. O segundo estágio de formação da lignina ocorre na parede celular e caracteriza-se pela reação de

oxidação desidrogenativa dos monolignóis disponíveis. As enzimas oxidadoras tais como peroxidases e isoenzimas correspondentes, atuam na polimerização da lignina, dentro da parede celular, formando um complexo coordenado com peróxido de hidrogênio.

A lignina tem sido considerada a macromolécula com vital importância na sustentação, resistência aos fatores biológicos, químicos e físicos (VANCE; KIRK; SHERWOOD, 1980). Além disso, desempenham um importante papel no crescimento e desenvolvimento da planta (ROGERS; CAMPBELL, 2004), que provavelmente permitiu a adaptação das plantas aquáticas à vida terrestre (BARCELO, 1997; INOUE et al., 1998).

A lignina também é indispensável em diversos processos biológicos dos quais os mais importantes são, assegurar a existência de vias rápidas de circulação da água, minerais e conferir rigidez necessária à manutenção da verticalidade do caule principal a vários metros de altura, não apresentando mobilidade entre paredes celulares, o que torna compreensível à preservação desse material ao longo de milhares de anos sob a face da terra, em condições rigorosas de alteração ambiental (ABREU; NASCIMENTO; MARIA, 1999).

Sob condições de anoxia, portanto, sua degradação torna-se extremamente difícil, de forma a exigir um alto teor de oxigênio durante o processo de degradação (DAVIN; LEWIS, 2000). Sua arquitetura molecular difere segundo a origem botânica dos táxons, entre células e até mesmo dentro da parede celular, respondendo aos efeitos abióticos e bióticos do ambiente (KITAYAMA et al., 2004). Normalmente as plantas detêm mecanismos coordenados de deposição da lignina, assim sua síntese obedece aos conceitos da topoquímica onde o tempo e local de deposição pode ser endógena e exogenamente afetado (DONALDSON, 2001).

O metabolismo dos fenilpropanóides inclui uma série complexa de caminhos bioquímicos que proporcionam às plantas milhares de combinações.

Muitos destes são intermediários na síntese de substâncias estruturais das células, como a lignina (BOATRIGT et al., 2004). Estes caminhos se ramificam gerando várias substâncias com funções essenciais no desenvolvimento da planta e interações ambientais (ALLINA et al., 1998).

Nestes caminhos há atuação de enzimas fundamentais para a biossíntese da lignina. Durante a formação dos precursores da lignina algumas dessas enzimas atuam sobre o núcleo aromático dos fenilpropanóides, introduzindo hidroxilas em C-3 e C-5 e as metilando em seguida enquanto outras desempenham importante papel na redução da cadeia lateral.

Dentre essas enzimas, a  $\alpha$ -galactosidase está bem distribuída em microrganismos, plantas e animais. De um modo geral, ela é capaz de hidrolisar tanto moléculas simples como moléculas mais complexas, como oligossacarídeos e polissacarídeos (GUIMARÃES et al., 2001). Esta enzima apresenta diferentes funções nas plantas, e está presente em todos os tecidos que contém  $\alpha$ -galactosídeos (ALANI; SMITH; MARKAKIS, 1989). Para Dopico, Nicolas e Labrador (1989) a  $\alpha$ -galactosidase tem participação no crescimento das plantas, já que reações enzimáticas que ocorrem na parede celular acabam promovendo a hidrólise de glucanos e a quebra de ligações dos seus 49 polissacarídeos, estando a  $\alpha$ -galactosidase envolvida nesse processo. Além disso, a mesma atua no reconhecimento celular, no transporte de açúcares e como glicoproteína na organização de sistemas multi-enzimáticos. Tal enzima tem também ação antibiótica contra as bactérias do solo, protegendo a planta contra substâncias  $\alpha$ -galactosídicas fitotóxicas produzidas por microrganismos invasores.

A  $\alpha$ -galactosidase tem também aplicação tecnológica na produção de açúcar de beterraba, sendo utilizada para remover a rafinose do melão de beterraba e aumentar o rendimento da sacarose (SHIBUYA et al., 1995).

A Cinamil Álcool Desidrogenase (CAD) catalisa o último passo na biossíntese do monolignol, reduzindo-os a aldeídos e nos álcoois correspondentes. A enzima CAD reduz vários aldeídos, durante diferentes fases de desenvolvimento. Além da função de regulação da lignificação, vários genes da CAD foram caracterizados em resposta a patógenos em plantas (KIEDROWSKI et al., 1992). A enzima CAD regula a composição da lignina G:S detectada em inúmeras plantas, cujo polimorfismo sugere que esta enzima apresenta especificidade diferenciada na composição da lignina de Gimnospermas e Angiospermas.

Celulase é um complexo enzimático, cujas enzimas atuam sinergicamente e estão subdivididas em três classes: endoglucanases, que quebram as ligações glicosídicas das cadeias de celulose criando novos terminais; celobio-hidrolases, responsáveis pela ação nos terminais levando à celobiose; e 1,4- $\beta$ -D-glucosidases que hidrolisam a celobiose à glicose. As endoglucanases atuam randomicamente nas regiões amorfas da celulose e de seus derivados, hidrolisando ligações glicosídicas  $\beta$ -(1,4). Sua atividade catalítica pode ser medida pela diminuição da viscosidade do meio decorrente da diminuição de massa molar média de celulose ou derivados de celulose.

A laccase entre outras oxidases também promove oxidação desidrogenativa dos monolignóis na parede celular (RANOCHA et al., 2002). A laccase catalisa a oxidação de diversos substratos como os polifenóis, diaminas e alguns compostos inorgânicos. As reações de oxidação com a laccase envolvem a transferência de elétrons de uma molécula para outra. Por outro lado, a laccase sozinha não é capaz de oxidar compostos não fenólicos. Embora o exato papel da laccase na degradação da lignina esteja por esclarecer, tem-se provado que, na presença de mediadores, compostos não fenólicos da lignina podem ser degradados.

A laccase catalisa a oxidação de vários compostos orgânicos acoplada à redução de oxigênio molecular em água. Esta enzima apresenta uma larga especificidade para o substrato redutor catalisando a oxidação de vários compostos aromáticos nomeadamente fenólicos. A sua função metabólica consiste na decomposição de polímeros aromáticos naturais bem como a polimerização de produtos de oxidação e a degradação de substâncias xenobióticas, desempenhando um papel extremamente importante na biodegradação de compostos lenhocelulósicos (JONSSON et al.,1995).

As glicosyltransferases são as enzimas responsáveis pela glicosilação que ocorre nas últimas etapas da biossíntese e a adição dos açúcares. Essas enzimas apresentam certo grau de flexibilidade com relação ao nucleotídeo doador quanto ao nucleotídeo receptor (TREFZER et al., 2001).

As quitinases estão presentes em bactérias, fungos, plantas, insetos, crustáceos e alguns vertebrados, podendo apresentar várias funções como metabolismo de quitina, mecanismos de defesa contra patógenos e estresse abiótico, nutrição e parasitismo (MATSUMOTO, 2006). Estas catalisam a hidrólise de quitina, um homopolímero linear de unidades de  $\beta$ -1,4 Nacetil-D-glucosamina (GlcNAc) (COLLINGE et al., 1993) que é comumente encontrado em exoesqueleto de insetos, concha de crustáceos e em parede celular de fungos e participam em diversas funções biológicas, como a defesa, digestão de nutrientes, morfogênese e patogênese. Essas são expressas constitutivamente em níveis relativamente baixos em todos os órgãos e tecidos das plantas, compartimentalizadas no vacúolo e apoplasto (KASPRZEWSKA, 2003).

As quitinases de plantas fazem parte do grupo de proteínas denominadas PR (proteínas relacionadas à patogênese), capazes de induzir resistência, local ou sistêmica, ao ataque de fungos e outros fitopatógenos (FRETTINGER et al., 2006). Posteriormente, descobriu-se que as proteínas PR, incluindo as quitinases, são também induzidas por vários outros estresses, como estiagem,

salinidade, danos mecânicos, metais pesados e reguladores do crescimento vegetal (PATEL et al., 2009).

A via metabólica da lignina e as enzimas envolvidas na sua síntese vem sendo caracterizadas nos últimos anos. Uma série de genes que codificam diferentes enzimas envolvidas na biossíntese da lignina foram identificados em diferentes espécies de plantas. A biossíntese de lignina está acoplada ao metabolismo dos fenilpropanóides, apresentando enzimas compartilhadas com outros processos metabólicos tais como as estudadas no presente trabalho: alfa-galactosidase, álcool cinâmico desidrogenase (CAD), endoglucanase, laccase, glycosiltransferase e chitinase.

Enquanto as etapas enzimáticas e os substratos envolvidos na biossíntese dos precursores primários das ligninas estão relativamente bem caracterizados, pouco se sabe a respeito da formação do polímero de lignina *per se*, sua estrutura *in situ* e sua biodegradação.

Em certos tipos de mutantes de milho e sorgo, um aumento na digestibilidade foi associado a uma redução no teor de lignina. Uma redução na atividade de CAD e catecol-O-metiltransferase (COMT), importantes enzimas envolvidas na biossíntese de lignina, vem sendo demonstrada. Visando compreender os mecanismos de regulação gênica envolvidos na biossíntese das ligninas, em vários trabalhos tem-se buscado a caracterização de enzimas e genes envolvidos nessa rota metabólica. Estas observações têm motivado diferentes grupos de pesquisa a alterarem o conteúdo ou a composição da lignina em plantas modelo, assim como culturas de interesse econômico, por meio de engenharia genética. O entendimento e a manipulação dos elementos envolvidos na regulação desses genes possibilitará a obtenção de plantas arbóreas e forrageiras com teores de ligninas mais adequados aos diversos fins industriais ou à pecuária.

Visando compreender os mecanismos de regulação gênica envolvidos na síntese de ligninas em plantas, ENDT et al. (2013) tiveram como objetivo isolar e caracterizar o gene codificador da enzima álcool cinamílico desidrogenase (CAD) de *E. saligna*, espécie arbórea para a produção de celulose e papel. Este trabalho representou um primeiro passo para o esclarecimento dos mecanismos gênicos envolvidos na biossíntese de ligninas em *E. saligna* e para a futura modulação dos teores ou composição deste biopolímero.

Rosa Junior et. al. (2005) ao estudarem a identificação de genes responsivos ao metil-jasmonato (MeJA) em cana-de-açúcar, moléculas sinalizadoras envolvidas no desenvolvimento da planta e na resposta aos estresses, concluíram que a busca por domínios conservados em proteínas desconhecidas e a análise digital do perfil de expressão de mRNA revelaram possíveis proteínas novas relacionadas a estresses induzidas por MeJA e os tecidos onde os genes regulados por MeJA são preferencialmente expressos.

Ferro et al., (2007) analisaram o perfil de expressão dos genes da cana-de-açúcar envolvidos na interação com *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, agente etiológico do raquitismo-da-soqueira. Eles observaram que na cultivar suscetível foi reprimido uma EST com similaridade à lipase, enzima de membrana, que faz parte da síntese do jasmonato, o qual ativa as defesas vegetais contra patógenos de plantas, observando dessa forma possíveis funções para os genes induzidos ou reprimidos nas cultivares de cana tolerante ou resistente ao raquitismo-da-soqueira.

Ao estudarem a análise de expressão de genes relacionados à biossíntese de lignina em sorgo, Ribeiro et al. (2012), observaram que modificações na atividade das enzimas presentes na via biossintética da lignina alteram o conteúdo de lignina na parede celular. Como exemplo, a regulação negativa da atividade das enzimas HCT e C3H que atuam no início da via é a mais eficiente para reduzir o teor de lignina. Chen e Dixon (2007) demonstraram que a

regulação negativa destes genes foi mais eficaz em reduzir o teor de lignina em plantas de alfafa transgênicas para os mesmos, do que a regulação negativa de genes cujas proteínas atuam posteriormente na rota, demonstrando a importância dos mesmos para síntese de lignina.

Estes trabalhos demonstram que a manipulação genética da via biossintética da lignina pode auxiliar no desenvolvimento de genótipos de cana-de-açúcar que apresentem composição de parede mais adequada para produção de cachaça artesanal. Portanto, o melhor entendimento da via poderá auxiliar no desenvolvimento de marcadores moleculares a serem utilizados em programas de melhoramento de cana-de-açúcar para seleção de materiais com menores níveis de lignina. Dessa forma, visando à alteração da composição ou teores de ligninas em plantas por meio da modulação da expressão de genes biossintetizantes, estudos mais aprofundados dos mecanismos de regulação gênica devem ser conduzidos.

## **2.6 Marcadores moleculares**

Atualmente uma das questões mais relevantes é entender como os elementos na seqüência de DNA são utilizados para a expressão de seus genes, em que condições cada produto gênico é sintetizado e, uma vez sintetizado, qual sua função.

Vários projetos objetivando estudar o conjunto de genes de algumas espécies de gramíneas foram desenvolvidos, como por exemplo, o projeto de seqüências expressas (ESTs- Expressed Sequence Tags) do arroz (SASAKI, 1998) e do milho (GAI et al., 2000), sendo também lançados programas para entender o mecanismo genético da cana-de-açúcar no Brasil, feitos pela COPERSUCAR e FAPESP.

Com o advento de projetos ESTs, como o SUCEST (Sugarcane EST Project), foram sugeridas novas técnicas capazes de avaliar a expressão de milhares de genes simultaneamente. Neste projeto, 26 bibliotecas de cDNA foram construídas a partir da extração de RNA total de várias fontes: calos, raízes, diferentes estágios de folhas, colmos, plantas infectadas com patógenos, etc. (VETTORE et al., 2001). Dessa forma, ESTs são obtidos, resultando em *clusters*, que são agrupamentos das ESTs de acordo com o alinhamento das seqüências consenso (no sentido 5'→3').

Nas últimas décadas, variações na seqüência de DNA têm sido intensamente exploradas como marcador genético para o mapeamento do genoma de várias espécies. Contudo, a tendência atual é considerar como características desejáveis para o marcador molecular ideal, a alta informação por loco e a facilidade e a rapidez com que se obtêm tais informações (OGLIARI, 1999).

Na cultura da cana-de-açúcar, as primeiras associações significativas detectadas foram por meio de marcadores RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) e as seguintes características: número de perfilhos, conteúdo de sacarose e fibra, peso fresco, diâmetro médio de colmos e perfilhos com flor ou com ferrugem (SILLS et al., 1995). Em uma progênie do cruzamento entre *S. officinarum* X *S. robustum* foram identificadas regiões genômicas associadas a QTL (Quantitative Trait Loci) referentes a várias características, dentre elas porcentagem de fibra e teor de sacarose. O acesso MQ77-340 foi avaliado para caracteres relacionados a açúcar, fibra, peso de colmo, toneladas de cana por hectare (TCH) e toneladas de açúcar por hectare (TSH). Para todos os caracteres analisados, foram mapeados vários marcadores com efeitos positivos e negativos (REFFAY et al., 2005).

Kido (2003), observou que na população SP 80-180 X SP80-4966 foram detectados pelas análises de ANAVA (Análise de Variância), regressão linear e

intervalo composto, associações significativas ( $P < 0,005$ ) de marcadores AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) com altura e diâmetro de colmos, número de perfilhos, brix (% no caldo), fibras (%), %POL na cana e tonelada de cana por hectare.

Outra variação dessa tecnologia são os microssatélites, também conhecidos como SSR que são marcadores baseados na amplificação de um a seis nucleotídeos, comumente repetidos de 10 a 60 vezes em tandem (GUPTA; VASISHT; BAHL, 1996). Porém, geralmente o número de repetições e o comprimento total desses SSRs nestas regiões são relativamente pequenos.

Dentre suas vantagens, podem-se destacar alta reprodutibilidade, herança mendeliana, codominância, distribuição casualizada por todo o genoma e bom nível de polimorfismo. Além disso, requer pouca quantidade de DNA para sua amplificação, permite a semi-automatização em ensaios mutiplex e são transferíveis entre genótipos, populações e laboratórios. Essas vantagens fazem com que os SSRs sejam ideais para o mapeamento e detecção de QTLs, desde que existam informações sobre a seqüência dos *primers* que amplificam os microssatélites (GRATTAPAGLIA, 2001).

Outro uso importante no estudo com marcadores moleculares faz com que o conhecimento de genes expressos diferencialmente durante o processo de infecção auxilie na elucidação dos mecanismos de respostas da planta que levam à tolerância a diversas doenças. A identificação de genes induzidos na variedade tolerante infectada pelo patógeno pode levar, ainda, ao estabelecimento de genes candidatos utilizáveis como marcadores moleculares em programas de melhoramento genético, ou no desenvolvimento de plantas geneticamente modificadas agregando características desejadas.

Com a aplicação de ferramentas biotecnológicas específicas, a exploração das seqüências obtidas da cana-de-açúcar tem possibilitado a análise do genoma complexo da cultura e a compreensão de quais são os genes e vias

metabólicas que controlam parâmetros bioquímicos e fisiológicos específicos e como esses são regulados, a fim de selecionar os caracteres de interesse para cada setor. Além do uso de marcadores moleculares na estimativa da divergência genética e na seleção de genitores com caracteres desejáveis por reduzir gastos na manutenção de populações experimentais, estes podem também acelerar o processo de obtenção dos genótipos desejáveis e pela sua eficiência, já que podem estar fisicamente ligados a locos que determinam a característica de interesse, não sendo influenciados pelo ambiente (ALZATE-MARIN et al., 2005).

## REFERÊNCIAS

ABREU, H. S.; NASCIMENTO, A. M.; MARIA, M. A. **Lignin and structure, Wood and Fiber**, v.31, p.426-433, 1999.

AGEITEC- Agência Embrapa de Informação Tecnológica, 2007.  
Disponível em: <<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONT000fiog1ob502wyiv80z4s473agi63ul.html>> Acesso em: 25 de março de 2013.

AGRIANUAL; **Anuário estatístico da agricultura brasileira**. São Paulo: Instituto FNP, 2013.

ALANI, S. R.; SMITH, D. M.; MARKAKIS, P.  $\alpha$ -galactosidases of *Vigna unguiculata*. **Phytochemistry**, New York, v. 28, n. 8, p. 2047-2051, 1989.

ALLINA, S. M; PRI-HADASH, A; THEILMANN, D. A; ELLIS, B. E; DOUGLAS, C. J. 4- Coumarate: coenzymeAligase in hybrid poplar. **Plant Physiology**, v. 116, p.743–54, 1998.

ALZATE-MARIN, A. L.; CERVIGNI, G. D. L.; MOREIRA, M. A; BARROS, E.G. Seleção assistida por marcadores moleculares visando ao desenvolvimento de plantas resistentes a doenças, com ênfase em feijoeiro e soja. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, p. 222-342, 2005.

BARBOSA, M. H. P.; SILVEIRA, L. C. I de.; MACÊDO, G. A. R e PAES, J. M.V. **Informe Agropecuário**. Cana-de-açúcar. Belo Horizonte: EPAMIG, v.28, n. 239, p. 1–120, 2007.

BARBOSA, M. H. P.; SILVEIRA, L. C. I. da. Melhoramento genético e Recomendação de Cultivares. In: SANTOS, F.; BORÉM, A.; CALDAS, C. **Cana-de-açúcar: bioenergia, açúcar e álcool- tecnologia e perspectivas**. Viçosa, MG: UFV, p. 313-331, 2010.

BARCELO, A. R. Lignification in plant cell walls. **Int. Rev. Cytol.**, v. 176, p.87–132, 1997.

BOATRIGT, J; NEGRE, F; CHEN, X; KISH, C. M; WOOD, B; PEEL, G; ORLOVA, I; GANG, D; RHODES, D; DUDAREVA, N. Understanding in Vivo Benzenoid Metabolism in Petunia Petal Tissue **Plant Physiology**, v.135, p.1993-2011, 2004.

CARVALHO, M. V de.; RODRIGUES, P. H. M.; LIMA, M. L. P.; ANJOS, I. A. dos.; Marcos LANDELL, M. G de A.; SANTOS, M. V. dos; PRADA E SILVA, L. F. Composição bromatológica e digestibilidade de cana-de-açúcar colhida em duas épocas do ano. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, São Paulo, v. 47, n. 4, p. 298-306, 2010.

CHEN, F.; DIXON, R. A. Lignin modification improves fermentable sugar yields for biofuel production. **Nature Biotechnology**, New York, v. 25, p. 759-761, 2007.

COLLINGE, D. B.; KRAGH, K. M.; MIKKELSEN, J. D; NIELSEN, K. K.; RASMUSSEN, U; VAD, K. Plant chitinases. **The Plant Journal**, v. 3, p. 31-40, 1993.

DAVIN, L. B.; LEWIS, N. G. Dirigent proteins and dirigent sites explain the mystery of specificity of radical precursor coupling in lignan and lignin biosynthesis, **Plant Physiology**, v.123, p.453-462, 2000.

DONALDSON, L. A. Lignification and lignin topochemistry — an ultrastructural view, **Phytochemistry**, v.57, n.6, p.859-873, 2001.

DOPICO, B.; NICOLÁS, G.; LABRADOR, E. Partial purification of cell wall  $\alpha$ -galactosidases and  $\alpha$ -arabinosidases from *Cicer arietinum* epicotyls: relationship with cell wall autolytic processes. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 75, p. 465-468, 1989.

ENDT, D. V.; COSTA, P.; ZAGO, M. K.; ZANETTINI, M. H. B.; PASQUALI, G. Genes de lignificação- Em busca do eucalipto transgênico com reduzidos teores de lignina. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**. Encarte especial. p. 152-159. Disponível em:  
<<http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio15/genes.pdf>> Acesso em: 25 de janeiro de 2013.

FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood chemistry, ultrastructure and reactions**. New York: Walter de Gruyter, 1989.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília: EMBRAPA, CENARGEN, 1998. p. 220.

FERRO, M. I. T.; BARROS, N. M. de; DABBAS, K. M.; LAIA, M. L.; KUPPER, K. C.; MORAES, V. A. de; FERRO, J. A.; ZINGARETI, S. Análise do perfil de expressão de genes da cana-de-açúcar envolvidos na interação com *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*. **Summa Phytopathologica**, v.33, n.2, p.154-166, 2007.

FRETTINGER, P.; HERRMANN, S.; LAPEYRIE, F.; OELMULLER, R.; BUSCOT, F. **Mycorrhiza**, v.16, p. 219, 2006.

GAI, X.; LAL, S.; XING L. et al. Gene discovery using the maize genome database ZmDB. **Nucleic Acids Research**, v. 28, n. 1, p. 94-96, 2000.

GRATTAPAGLIA, D. Marcadores moleculares em espécies florestais: *Eucalyptus* como modelo. In: NASS, L. L.; VALOIS, A. C. C.; MELO, I. S.; VALADARES-ILGLIS, M. C. **Recursos genéticos e melhoramento**: plantas. Rondonópolis: Fundação MT, 2001. p. 967- 2001.

GUIMARÃES, V. M. et al. Characterization of  $\alpha$ -galactosidases from germinating soybean seed and their use for hydrolyses of oligosaccharides. **Phytochemistry**, v. 58, p. 67-73, 2001.

GUPTA, R.; VASISHT, S.; BAHL, V. K. Correlation of lipoprotein(a) to angiographically defined coronary artery disease in Indians. **Int J Cardiol**, v. 57, p. 265-270. 1996.

HENDRIKS, A. T. W. M.; ZEEMAN, G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, n. 100 p. 10-18, 2009.

INOUE, K.; SEWALT, V.J.; MURRAY, G.B.; NI, W. STURZER, C.; DIXON, R.A. Developmental expression and substrate specificities of alfalfa caffeic acid 3-Omethyltransferase and caffeoyl coenzyme A 3-Omethyltransferase in relation to lignification. **Plant Physiology**, v.117, p.761-770, 1998.

JONSSON, L., SJOSTROM, K., HAGGSTROM, I.; NYMAN, P. O. Characterization of a laccase gene from the white-rot fungus *Trametes versicolor* and structural features of basidiomycete laccases. **Biochim. Biophys. Acta**, n. 1251, p. 210-215, 1995.

KASPRZEWSKA, A. **Cell. Mol. Biol. Lett**, v. 8, p. 809.2003.

KIDO, E. A. **Mapeamento de marcadores moleculares AFLP em população derivada de clones elite de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) e suas associações com caracteres agronômicos**. 2003. 164f. Tese (Doutorado em Energia Nuclear na Agricultura)- Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

KIEDROWSKI, S; KAWALLECK, P; HAHLBROCK, K; SOMSSICH, I. E; DANGL, J. L. Rapid activation of a novel plant defense gene is strictly dependent on the *Arabidopsis RPM1* disease resistance locus. **EMBO J**, v. 11, p. 4677- 4684, 1992.

KYTAYAMA, K.; SUZUKI, S.; HORI, M.; TAKYU, M.; AIBA, S.I.; MALAJALAP-LEE, N.; KIKUZAWA, K. On the relationships between leaf-litter lignin and net primary productivity in tropical rain forests. **O junho ecologia**, v.140,p.335-339, 2004.

LANDELL, M. G. de A.; BRESSIANI, J. A. C. Melhoramento genético, caracterização e manejo varietal. In: DINARDO-MIRANDA, L. L.; VASCONCELOS, A. C. M. de.; LANDELL, M. G. de A. **Cana-de-açúcar**. Campinas, SP: Instituto Agrônômico, 2010. p. 101-156.

LARS, H.; JOHANSSONB, G.; PETTERSSONB, G.; LIA, J.; LJUNGQUISTC, P.; HENRIKSSONA, G. Do the extracellular enzymes cellobiose dehydrogenase and manganese peroxidase form a pathway in lignin biodegradation? **FEBS**, v. 477, n. 1, p. 79-83, 2000.

-----Lei nº 10.853, 4 de Agosto de 1992. Cria o Programa Mineiro de Incentivo à Produção de Aguardentes- PRÓ-CACHAÇA, e dá outras providências. **Minas Gerais**, Belo Horizonte, 5 de ago. de 1992. Diário do Executivo, p. 9. Disponível em: <<http://www.almg.gov.br>>. Acesso em: 2013.

MATSUMOTO, K. S. Fungal chitinases. IN: Advances in Agricultural and Food Biotechnology, p. 289-304. ISBN: 81-7736-269-0 Editors: Ramón Gerardo Guevara-González and Irineo Torres-Pacheco, 2006.

MONTIES, B. Molecular structure and biochemical properties of lignins in relation with possible self-organization of lignin networks. **Annales des Sciences Forestières**, v. 46, p. 846-855, 1989.

NORTHCOTE, D. H. Control of plant cell wall biogenesis: an overview. **ACS Symp. Ser**, v. 399, p. 1-15, 1989.

OGLIARI, J. B. Identificação e localização de um gene de resistência de milho a *Exserohilum turcicum* (Pass.) Leonard & Suugs através do uso de marcadores microssatélites. 1999. 115 p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo. Piracicaba, 1999.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V. T.; VANDENBERGHE, L. P. S.; MOHAN, R. Biotechnological potential of agro-industrial residues: sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 74, n. 1, p. 81-87, 2000.

PATEL, A. K.; SINGH, V. K.; YADAV, R. P.; MOIR, A. J.; JAGANNADHAM, M. V. **Plant Mol. Biol.**, v. 71, p. 277, 2009.

RANOCHA, P.; CHABANES, M.; CHAMAYOU, S.; JAUNEAU, A.; BOUDET, A. M.; GOFFNER, D. Laccase Down-Regulation Causes Alterations in Phenolic Metabolism and cell wall structure in poplar. **Plant Physiology**, v.129, n.1, p.145-155, 2002.

REFFAY, N.; JACKSON, P. A.; AITKEN, K. S.; HOARAU, J. Y.; D'HONT, A.; BESSE, P.; MCINTYRE, C. L. Characterization of genome regions incorporated from an important wild relative into Australian sugarcane. **Molecular Breeding**. v. 15, p. 367-381, 2005.

RIBEIRO, P. P.; BARROS, B. de A.; PARRELLA, R. A. da C.; SCHAFFERT, R. E.; DAMASCENO, C. M. B. da. Análise de expressão de genes relacionados à biossíntese de lignina em sorgo. VII Encontro da Rede de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação em Biocombustíveis de Minas Gerais. 11 a 13 de abril, 2012, Sete Lagoas-MG.

ROGERS, L. A.; CAMPBELL, M. M. The genetic control of lignin deposition during plant growth and development. **New Phytologist**, v.164, n.1 p.17, 2004.

ROSA JUNIOR R., V. E. de; NOGUEIRA, F. T. S.; MENOSSI, M.; ULIAN, E. C.; ARRUDA, P. Identification of methyl jasmonate-responsive genes in sugarcane using cDNA arrays. **Braz. J. Plant Physiol.** v. 17, n. 1, p. 173-180, 2005.

SASAKI, T. The rice genome project in Japan. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**. v. 95, p. 2027-2028, 1998.

SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO A MICRO E PEQUENAS EMPRESAS-SEBRAE. Disponível em: <http://www.sebrae.com.br>. Acesso em: 2006.

SEBRAE-MG. **Plano de Reestruturação da Cadeia da Cachaça de Alambique de Minas Gerais**. Belo Horizonte, 2002. 53p. Disponível em: <<http://www.sebraemg.com.br/arquivos/programaseprojetos/agronegocios/Cachaça/Plano.pdf>>. Acesso em: 27 out. 2011.

SHIBUYA, H. et al. Purification and some properties of alpha-galactosidase from *Penicillium purpurogenum*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 59, p. 2333-2335, 1995.

SILLS, G. R.; BRIDGES, W.; AL-JANABI, S. M.; SOBRAL, B. M. Genetic analysis of agronomic traits in crosses between sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) and presumed progenitor (*S. robustum* Brandes, Jew. Ex Grassl). **Molecular Breeding**, v. 1, p. 355-363, 1995.

SILVA, E. A. DA.; FERREIRA, J. J.; RUAS, J. R. M.; PAES, J. M. V.; MACÊDO, G. A. R. Utilização da cana-de-açúcar na alimentação de ruminantes. In: **Informe Agropecuário**. Belo Horizonte, MG: EPAMIG, v. 28, n.239, p. 102- 119, 2007.

SUCEST. Disponível em: <<http://sucest.lad.ic.uni.camp.br/>>. Acesso em: 17/01/2013.

TREFZER, A.; FISCHER, C.; STOCKERT, S.; WESTRICH, L.; KUNZEL, E.; GIRRESER, U.; ROHR, J.; BECHTHOLD, A. Elucidation of the function of two glycosyltransferase genes (lanGT1 and lanGT4) involved in landomycin biosynthesis and generation of new oligosaccharide antibiotics. **Chem. Biol.**, n. 8, v. 12, p. 1239-1252, 2001.

VANCE, C. P.; KIRK, T. K.; SHERWOOD, R. T. Lignification as a mechanism of disease resistance. *Annual Review of Phytopathology*. v. 18, p. 259-288, 1980.

VETTORE, A. L.; SILVA, F. R.; KEMPER, E. L. et al. The libraries that made *SUCEST*. *Genetics and Molecular Biology*, v. 24, p. 1-7, 2001.

## **CAPÍTULO 2**

### **MARCADORES DE DNA ASSOCIADOS AO TEOR DE FIBRA EM *SACCHARUM* spp.**

## RESUMO

O menor teor de fibra da cana-de-açúcar permite maior extração do caldo, pois no alambique artesanal, utiliza-se moendas simples, situação diferente da produção de açúcar e álcool. Assim, para produção de cachaça artesanal torna-se importante o desenvolvimento de genótipos de *Saccharum* spp. com baixo teor de fibra. Marcadores moleculares contribuem para o direcionamento dos programas de melhoramento e reduzem o tempo gasto para a obtenção de novas cultivares. Objetivou-se, neste trabalho, buscar em bancos de dados, seqüências expressas de proteínas relacionadas ao teor de fibra em cana-de-açúcar e posterior desenho de *primers* a fim de testar a eficiência destes *primers* na identificação dos teores de fibra em cultivares comerciais. Foram identificadas seqüências expressas das proteínas alpha-galactosidase, álcool cinâmico desidrogenase (CAD), endoglucanase, laccase, glycosiltransferase e chitinase. A partir dessas seqüências foram desenhados 11 *primers simple sequence repeat* (SSR) que foram posteriormente testados em 21 cultivares e 2 espécies. De acordo com o dendrograma gerado, observou-se que no grupo 1 foram agrupadas cultivares com baixo e médio teores de fibra e somente do grupo CTC (Centro de Tecnologia Canavieira); no grupo 2 foram agrupadas duas cultivares RB (RIDESA) com alto e médio teores de fibra; o grupo 3 possui cultivares RB, todas as cultivares SP (São Paulo) e as espécies, correlacionando médio e alto teores de fibra na sua grande maioria; o grupo 4 possui somente cultivares CTC com médio e alto teores de fibra e o último grupo com cultivares CTC somente com alto teores de fibra. Assim, a análise comparativa destes genes poderá servir para a identificação de marcadores moleculares em programas de melhoramento genético, bem como em projetos que visem à manipulação do metabolismo de lignina em cana-de-açúcar. Nenhum dos marcadores das proteínas analisadas puderam ser usados como um padrão para identificação de teor de fibra na cana-de-açúcar.

**Palavras-chave:** Cana-de-açúcar. Lignina. Sequências expressas. Banco de germoplasma.

## ABSTRACT

The lower fiber content in sugar cane allows a greater juice extraction because, in a handmade alembic, simple mills are used, which is different from the production of sugar and alcohol. Thus, for the production of handmade cachaça, the development of *Saccharum* spp. genotypes with low fiber content becomes important. Molecular markers contribute to the direction of improvement programs and reduce the time spent on the obtention of new cultivars. The objective of this study was to seek, in databases, expressed sequences of protein that are related to the fiber content in sugar cane and a subsequent primer design, in order to test the efficiency of these primers in the identification of fiber contents in commercial cultivars. Expressed sequences of the following proteins were identified: alpha-galactosidase, cinnamyl alcohol dehydrogenase (CAD), endoglucanase, laccase, glycosyltransferase and chitinase. From these sequences, 11 simple sequence repeat (SSR) primers were designed, which were subsequently tested on 21 cultivars and 2 species. According to the generated dendrogram, it was observed that, in group 1, cultivars with low and medium fiber contents, and only from the CTC (Centro de Tecnologia Canavieira) group, were grouped; in group 2, two RB (RIDESA) cultivars with high and medium fiber contents were grouped; group 3 has RB cultivars, all SP (São Paulo) cultivars and the species, mostly correlating medium and high fiber contents; group 4 has only CTC cultivars with medium and high fiber contents and the last group with CTC cultivars only with high fiber contents. Thus, the comparative analysis of these genes can be used for the identification of molecular markers in genetic improvement programs, as well as in projects that aim to manipulate lignin metabolism in sugar cane. None of the markers of the analyzed proteins could be used as a standard for the identification of the fiber content in sugar cane.

**Keywords:** Sugar cane. Lignin. Expressed sequences. Germplasm bank.

## 1 INTRODUÇÃO

A produção de cachaça no Brasil é uma atividade desenvolvida em praticamente quase todo território nacional desde a era colonial. Além da produção de etanol e açúcar, o agronegócio da cachaça de alambique é de grande destaque nacional. Com o apoio dos órgãos de fomento, pesquisa e associações de produtores, o setor empenha-se na divulgação e valorização da cachaça mineira, que vem ocupando espaço nas adegas da elite brasileira, sendo inclusive reconhecida mundialmente como bebida exclusiva do Brasil. A cachaça mineira é um produto tipicamente rural com porte do alambique e o volume de produção limitado aos recursos disponíveis na propriedade. Há atualmente o crescimento de um novo grupo de consumidores de cachaça, os consumidores das classes sócio-econômica média e alta, motivados pela melhoria da qualidade da bebida e pelas ações promocionais realizadas, além da divulgação da marca Cachaça de Minas nos mercados mundiais, notadamente na Europa.

Nos programas de melhoramento genético da cana-de-açúcar buscam-se a obtenção de cultivares que agreguem uma série de atributos favoráveis, tanto no âmbito agrônômico, como no industrial. É com esse intuito que pesquisas estão sendo realizadas para que o teor de fibra esteja inserido nos parâmetros de qualidade, de forma a evitar aumentos de perdas de sacarose (SEGATO et al., 2006). Até o momento, cultivares comerciais de cana-de-açúcar registradas no Brasil, apresentam baixo, médio e alto teor de fibra, e, segundo Ripoli e Ripoli (2004) geralmente são utilizadas as que apresentam médio e alto teor de fibra (11 a 13%). Já para a fabricação de cachaça, um baixo teor de fibras seria mais interessante.

A fibra da cana-de-açúcar é a parte sólida da planta formada por celulose, hemicelulose, ligninas, pentosanas, pectinas e outros componentes. É o

material que dá sustentação à planta e a formação aos órgãos de condução da seiva e estocagem do caldo e seus constituintes (FERNANDES, 2000). Está relacionada com a colheita, normalmente na condição de tornar os colmos eretos evitando o tombamento e, na indústria, com o balanço térmico da usina. A fibra também é empregada nos cálculos de determinações expressas em porcentagem de cana, como a POL (sacarose aparente), ATR (Açúcar Total Recuperável), AR (Açúcar Redutor) e demais parâmetros que definem a qualidade da cana-de-açúcar como matéria-prima. Há dificuldade de se conhecer o teor real de fibra em função dos vários fatores envolvidos (STUPIELLO, 2001). De acordo com Marques, Marques e Tasso Junior (2001) na fase de extração o aumento no teor de fibra de cana resulta na dificuldade da moenda em extrair do caldo a sacarose. Isso acontece, pois a fração do caldo, uma vez extraída, em parte é reabsorvida pela fibra da cana. A quantidade reabsorvida varia de forma proporcional ao teor de fibra na matéria-prima, o que resulta em maiores perdas de sacarose no bagaço, ou seja, menor eficiência nas moendas, usadas na produção de cachaça artesanal.

No processo de lignificação, algumas proteínas se fazem presentes, atuando na polimerização ou degradação da lignina, dentre elas a  $\alpha$ -galactosidase, álcool cinamílico desidrogenase (CAD), endoglucanase, laccase, glycosyltransferase e chitinase estudadas no presente trabalho. Sendo que a enzima  $\alpha$ -galactosidase se encontra bem distribuída em microrganismos e tem participação no crescimento das plantas (GUIMARÃES et al., 2001); a CAD tem a função de regulação da lignificação (KIEDROWSKI et al., 1992); as endoglucanases quebram as ligações glicosídicas das cadeias de celulose (OGEDA; PETRI, 2010); a laccase atua na degradação da lignina (LEWIS; SARKANEN, 1998); as glycosyltransferases são as enzimas responsáveis pela glicosilação que ocorre nas últimas etapas da biossíntese da lignina (TREFZER

et al., 2001) e as chitinases catalisam a hidrólise de quitina e são reguladoras do crescimento vegetal (PATEL et al., 2009).

O projeto genoma da cana-de-açúcar (SUCEST) representou um marco histórico na biotecnologia e no melhoramento da cultura ao sequenciar mais de 260.000 genes expressos, possibilitando a identificação e isolamento de genes de interesse econômico. Com isso, conjunto de dados de ESTs, etiqueta de sequência expressa, estão sendo desenvolvidos. Associado a isso, a evolução de ferramentas de bioinformática permite a rápida identificação e o desenvolvimento de marcadores, representando uma alternativa para o desenvolvimento de *primers*, para a identificação de características importantes em cultivares de cana-de-açúcar.

Para a espécie *Saccharum officinarum*, é de extrema relevância a compreensão do seu complexo genoma com consequência direta no melhoramento genético da espécie. Analisando os ESTs, por exemplo, pode-se inferir sobre fatores biológicos vitais ao desenvolvimento da planta, como vias de transduções de sinais, genes responsáveis pelo desenvolvimento da planta, estresse biótico e abiótico, regulação gênica, presença de elementos transponíveis, análise de polimorfismos, constituição das organelas e vários outros assuntos relacionados ao metabolismo da planta (ARRUDA, 2001).

Porém, até o momento, não foram identificados marcadores moleculares associados à característica teor de fibra. Nesta pesquisa objetivou-se buscar em bancos de dados, seqüências expressas de proteínas relacionadas ao teor de fibra em cana-de-açúcar e posterior obtenção de marcadores.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Genética Molecular do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

### 2.1 Seleção das sequências

Para a seleção de ESTs, foram realizadas buscas no banco de dados SOGI(SaccharumofficinarumGeneÍndex[http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/CGI-bin/tgi/gimain.pl?gudb=s\\_officinarum](http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/CGI-bin/tgi/gimain.pl?gudb=s_officinarum)) usando palavras chave relacionadas ao teor de fibra, característica importante na produção de cachaça, juntamente com sequências obtidas no UniGene disponíveis no NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/UGOrg.cgi?TAXID=4547>). Os 11 *primers* desenhados correspondem às sequências das proteínas alpha-galactosidase, álcool cinamílico desidrogenase (CAD), endoglucanase, laccase, glycosiltransferase e chitinase.

### 2.2 Desenho dos *primers*

As sequências de ESTs selecionadas foram salvas no formato FASTA e armazenadas em arquivo de texto. Foi utilizado o programa Primer3 ([www.frodo.wi.mit.edu](http://www.frodo.wi.mit.edu)) (ROZEN; SKALETSK, 2000) para o desenho dos *primers*. Os parâmetros físicos analisados foram semelhantes com a finalidade de assegurar o desempenho entre os pares de *primers*. Os *primers* foram sintetizados pela Invitrogen.

As sequências dos marcadores desenhados por meio do programa PRIMER3, bem como as temperaturas de anelamento estão disponíveis na Tabela 1.

Tabela 1 Marcadores moleculares, com suas respectivas seqüências e temperaturas de anelamento, utilizados na análise molecular em genótipos de cana-de-açúcar.

Loco	Seqüência (5'→ 3')	T. Anelamento
ALFAGALAC1	F: CGT CTC TGC TCT GCA CTC TG R: ATA CCA CGC TTG CCC ACT T	52°C
ALFAGALAC2	F: ATA GAT GAT TGC TGG GCA GA R: GGT GTC AGG ACA TAC ATC TTG C	52°C
CAD1	F: GGC TTT CTT TCC GAA GGC TA R: GCA CCG TGT CGA TGA TGT AG	52°C
CAD2	F: ACC TCG GGG CTT CAA AGT A R: CAC CTC CTC GAC GTT GCT	52°C
ENDO1	F: CGT CGA CCA GAA GTT TGT GA R: GGC AGC CAT TTC AGA TGC TA	52°C
ENDO2	F: CGA TAC AGC CCC AAT GGA T R: TGG GAA CAT TGG AGG AAT TG	52°C
ENDO3	F: CGC CAT CAA GTT CAA CTA TCC R: AGT ACC ACC CAG GCG TGT CT	52°C
LACC1	F: CGT CTT CTC CGC ATG TCC R: GCG GTG GTG TTG TCG AAC	55°C
LACC2	F: CTG ACG ACG CCT CCA AAC R: ATC TAC CCC CTC GGA TGA TG	55°C
GLYCOSIL1	F: GCG GCC AAG GAG AGA GTG R: GCA GCA TCT TGC GGA AGT C	50°C
CHIT1	F: GAG GAT CTT GGC GGT CCT R: TTT TTA AGC AGG TGA GGT TGG	52°C

Alpha-galactosidase (ALFAGALAC), álcool cinâmílico desidrogenase (CAD), endoglucanase (ENDO), laccase (LACC), glycosiltransferase (GLYCOSIL) e chitinase (CHIT1).

### 2.3 Material vegetal

Utilizaram-se as cultivares CTC1, CTC2, CTC7, CTC8, CTC9, CTC14, CTC15, CTC16, RB925345, RB867515, RB935744, RB855453, RB835486, RB925211, SP81-3250, SP80-1842, RB72454, SP83-2847, SP89-1115, SP84-2025, SP91-1285 e como testemunhas a cana “Caiana” (*Saccharum officinarum* L.), por ser a cana de maior maciez, apresentando baixo teor de fibra e alta riqueza em sacarose e *Saccharum spontaneum* por possuir características de alto teor de fibra e por ser pobre em açúcar.

As cultivares foram obtidas do painel de variedades localizado no campus na Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

A seguir, na Tabela 2 são apresentadas as classificações quanto aos teores de fibras das cultivares utilizadas no trabalho, de acordo com as características que cada programa de melhoramento disponibiliza quando liberação para comercialização. A avaliação do teor de fibra foi feita pelo método de prensa e sua classificação se dá de acordo com os seguintes parâmetros: baixo teor de fibra (menor que 11%), médio teor de fibra (11-13%) e alto teor de fibra (maior que 13%) (RIPOLI; RIPOLI, 2004).

Tabela 2 Classificação dos teores de fibra das cultivares utilizadas (1 a 23 cultivares)

<b>Cultivares</b>	<b>Teor de fibra (%)</b>
1) CTC1	Baixo
2) CTC2	Médio
3) CTC7	Médio
4) CTC8	Alto
5) CTC9	Médio
6) CTC14	Alto
7) CTC15	Alto
8) CTC16	Alto
9) RB925345	Alto
10) RB867515	Médio
11) RB935744	Médio/alto
12) RB855453	Médio
13) RB835486	Médio
14) RB925211	Médio/alto
15) SP81-3250	Alto
16) SP80-1842	Alto
17) RB72454	Médio
18) SP83-2847	Médio
19) SP89-1115	Baixo
20) SP84-2025	Alto
21) SP91-1285	Médio
22) <i>S. officinarum</i>	Baixo
23) <i>S. spontaneum</i>	Alto

Baixo teor de fibra (menor que 11%), médio teor de fibra (11-13%) e alto teor de fibra (maior que 13%) (RIPOLI; RIPOLI, 2004).

## 2.4 Extração do DNA

As folhas jovens foram coletadas de cada planta, pela manhã, ainda úmidas. Em seguida, foram armazenadas em sacos plásticos e colocadas em isopor com gelo para posterior extração do DNA, seguindo protocolo de Ferreira e Gattapaglia (1998) para extração de DNA genômico.

As folhas foram maceradas em N<sub>2</sub> líquido até a obtenção de um pó bem fino. Após isso, foram adicionados, a 200 mg do tecido vegetal, 350 µL do tampão de extração CTAB 2% (CTAB 2%; 100 mM Tris-HCl pH 7,8; 20 mM de EDTA pH 8,0; 1,4 mM NaCl; 2% de 2β mercaptoetanol) e incubados a 65°C, por 1 hora, homogeneizando a cada 15 minutos. Ao final deste período, resfriou-se as amostras por 5 minutos e foram adicionados 350 µL de clorofórimo-álcool isoamílico (24:1) que foram homogeneizados por 25 minutos no agitador por inversão para obtenção de uma emulsão, que posteriormente foi centrifugada, por 10 minutos, a 14.000 rpm. Ao sobrenadante foram adicionados 250 µL de isopropanol gelado e a emulsão foi misturada por inversão 5 vezes e acondicionada no freezer por 1 hora. Em seguida a emulsão foi centrifugada por 10 minutos, a 14.000 rpm. Em seguida, foi descartado o sobrenadante e adicionados 140 µL de etanol 70% gelado para a precipitação do DNA, homogeneizando-se manualmente os tubos, que foram centrifugados a 14.000 rpm por 10 minutos. Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado, deixando os tubos secarem à temperatura ambiente até a completa evaporação da solução de etanol. Após a secagem, o pellet foi ressuscitado com 50 µL de TE pH 8,0. Em seguida, foram adicionados 2 µL de RNase (10 mg/mL) e as amostras foram incubadas, a 37°C, por 30 minutos.

O DNA foi quantificado por meio do espectrofotômetro Nano Vue e a sua qualidade foi avaliada em gel de agarose 0,7%.

## 2.5 Reações de PCR

As reações de amplificação tiveram volume final de 12,01 µl, contendo, 10 ng de DNA, 0,2 mM de cada dNTP, 0,4 mM do oligonucleotídeo iniciador, tampão de reação 1X, e 0,4 unidades de Taq polimerase. Em seguida as reações foram amplificadas em termociclador Eppendorf MasterCycler Gradiente 5331. Após a desnaturação inicial a 94° C por dois minutos, cada ciclo de amplificação correspondeu a: 94° C por 45 s, 15 s de anelamento (conforme a temperatura de cada par de *primers* identificada através de um gradiente de temperatura variando de 50° C a 55° C) e elongação a 72° C por 30 s. Após 32 ciclos, procedeu-se a extensão final por 2 min a 72° C.

Os produtos de amplificação foram separados em gel de poliacrilamida 8% imerso em tampão TBE (0,45 M de tris-borato, 0,01 M de EDTA pH 8,0) a 140 V durante 2 horas. Decorrido este tempo, os géis foram tratados solução de nitrato de prata a 0,2% e solução reveladora (NaOH). Após dez minutos de tratamento em cada solução, os produtos de amplificação foram visualizados em transluminador de luz branca e fotografados em câmara fotográfica. Os produtos da amplificação, visualizados no gel, produzidos por cada *primer*, foram utilizados na elaboração de uma matriz de similaridade genética, por meio do registro da presença (1) e da ausência (0) de bandas no perfil eletroforético de cada cultivar.

## 2.6 Análise

A estimativa da similaridade genética ( $S_{gij}$ ) entre cada par de genótipos foi calculada pelo coeficiente de Jaccard, representado pela seguinte expressão:

$$\text{Coeficiente de jaccard: } S_{gij} = \frac{a}{a + b + c} ,$$

sendo

a= presença de banda em ambos os genótipos i e j;

b= presença de banda no indivíduo i e ausência de banda no indivíduo j;

c= ausência de banda no indivíduo i e presença de banda no indivíduo j.

Com base no coeficiente de similaridade de Jaccard, os genótipos foram agrupados pelo Unweighted Pair-Group Method, ou UPGMA, utilizando-se o programa XLSTAT (Addinsoft®, versão 2011.2.04).

Em seguida foi calculada a dissimilaridade, com o objetivo de representar o grau de divergência genética entre as diferentes cultivares. A dissimilaridade é um complemento da similaridade ( $Dis = 1 - Sim$ ), é um índice de divergência.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram analisadas as seqüências do banco de dados associadas à característica teor de fibra e gerados os *primers*.

#### 3.1 Desenho dos *primers*

Como estratégia de utilizar seqüências aleatórias buscou-se aumentar a probabilidade de serem identificados marcadores associados à característica teor de fibra, a partir de componentes que compõem ou degradam a lignina, principal constituinte da fibra.

#### 3.2 Amplificação dos fragmentos

Os 11 pares de *primers* (Alfagalac 01; Alfagalac 02; CAD 01; CAD 02; Endo 01; Endo 02; Endo 03; Lacc 01; Lacc 02; Glycosil 01e Chiti 01) desenhados para teor de fibra testados nos 23 genótipos de cana proporcionaram 146 produtos de amplificação, os quais forneceram uma média de 13,27 bandas por par de *primer*.

Os coeficientes de dissimilaridade de Jaccard (SSR) para todos os 23 genótipos variaram de 0,150 a 0,544., sendo a dissimilaridade média entre os 23 genótipos estudados de 38,11%. Um corte feito a 0,386 (média) separou os genótipos em cinco grupos, o primeiro grupo (cor verde) é formado pelas cultivares CTC1, CTC2 e CTC7; o segundo grupo (cor rosa) é formado por RB925345 e RB861515; o terceiro grupo (cor vermelha) é formado por RB935744, RB855453, RB835486, RB925211, SP81-3250, SP80-1842, RB72454, SP83-2847, SP89-1115, SP84-2025, SP91-1285, *S. officinarum* e *S.*

*spontaneum*; o quarto grupo (cor azul) é formado por CTC8, CTC9 e CTC14 e o quinto e último grupo (cor cinza) é formado por CTC 15 e CTC16 (Figura 1).

A maior dissimilaridade genética (0,544) foi observada entre as cultivares RB835486 e CTC1. A primeira cultivar apresenta médio teor de fibra e a segunda baixo teor. A menor dissimilaridade (0,150) foi observada entre as cultivares SP80-1842 e RB72454, com alto e médio teores de fibra, respectivamente, que encontram-se no mesmo grupo de acordo com o dendrograma, podendo ser explicada provavelmente por terem como genitores cultivares CP (Canal Point (EUA)), mais especificamente a cultivar CP53-76.

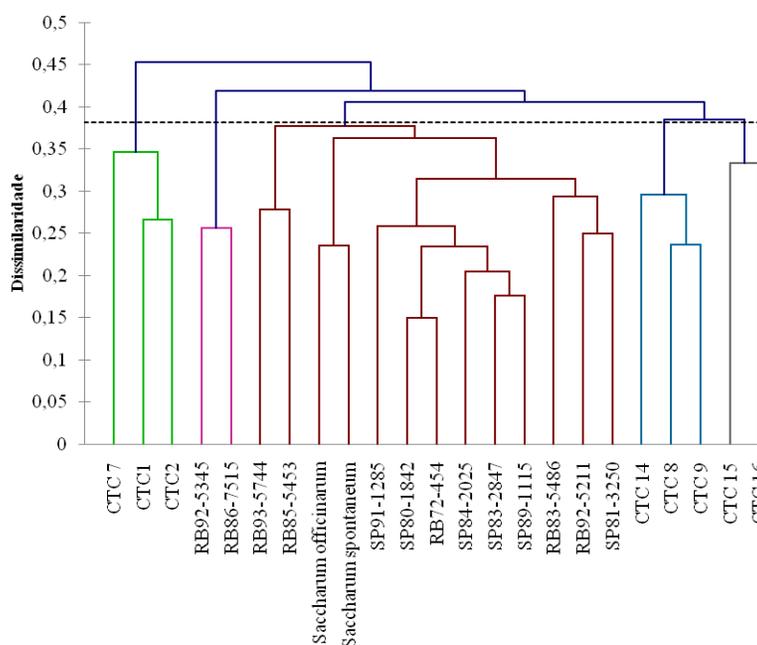


Figura 1 Dendrograma gerado pelo método UPGMA por meio da matriz de dissimilaridade de Jaccard, por *primers* SSR, entre acessos de *Saccharum* spp..

De acordo com o dendrograma e as classificações dos teores de fibras apresentadas na Tabela 2, observa-se que no grupo 1 (CTC1, CTC2 e CTC7)

foram agrupadas cultivares com baixo e médio teores de fibra e somente do grupo CTC (Centro de Tecnologia Canavieira); o grupo 2 (RB925345 e RB861515) agrupa duas cultivares RB (RIDESA) com alto e médio teores de fibra; o grupo 3 (RB935744, RB855453, RB835486, RB925211, SP81-3250, SP80-1842, RB72454, SP83-2847, SP89-1115, SP84-2025, SP91-1285, *S. officinarum* e *S. spontaneum*) possui cultivares RB, todas as cultivares SP (São Paulo) e as testemunhas, correlacionando médio e alto teores de fibra na sua grande maioria; o grupo 4 (CTC8, CTC9 e CTC14) possui somente cultivares CTC com médio e alto teores de fibra e o último grupo (CTC 15 e CTC16) com cultivares CTC somente com alto teores de fibra.

Lopes (2011) avaliou o uso da abordagem de mapeamento por associação na detecção de associações importantes entre marcadores moleculares do tipo SSR e AFLP e os caracteres altura, diâmetro e número de colmos, fibra % cana, Pol % cana e tonelada de cana por hectare em cana-de-açúcar, em quatro regiões. A análise de associação sugeriu doze associações envolvendo os caracteres número de colmos, Pol % cana e tonelada de cana por hectare, não conseguindo nenhuma associação com a característica fibra.

Trabalhando com mapeamento de QTLs em cana-de-açúcar, Anoni (2011) objetivou detectar QTL em uma população de irmão completo de cana-de-açúcar utilizando o método de mapeamento por intervalo em uma população de 220 indivíduos. Os caracteres avaliados foram % fibra, Pol %, produção de cana por parcela e produção de açúcar por parcela. Observou-se que 57 QTLs foram mapeados, sendo 14 QTL para o caráter fibra ( $R^2 = 12,6\%$ ), 19 para Pol%, 12 para produção de cana por parcela e 12 para produção de açúcar por parcela. Assim, de acordo com o autor, seu trabalho contribuirá para futuros estudos que tenham como objetivo a melhor compreensão da arquitetura genética dos caracteres quantitativos da cana-de-açúcar.

Embora as cultivares utilizadas sejam oriundas de programa diferentes, a similaridade foi muito grande tanto dentro dos grupos quanto entre os grupos (Figura 2). As razões para isso podem ser decorrentes do número baixo de *primers* utilizados e até relacionadas ao grau de parentesco entre os indivíduos mesmo sendo de programas diferentes.

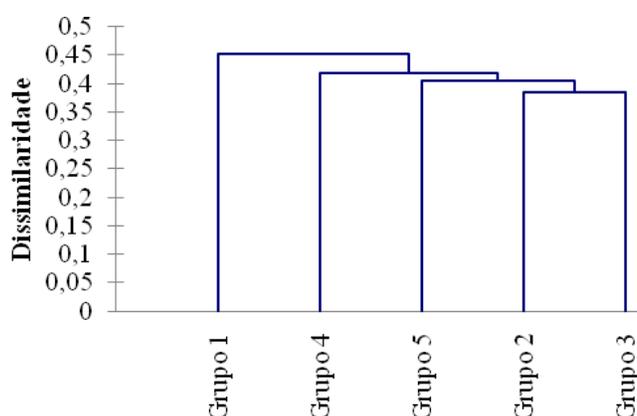


Figura 2 Dendrograma com as divisões dos grupos gerados pelo método UPGMA por meio da matriz de dissimilaridade de Jaccard, por *primers* SSR, entre acessos da coleção da UFLA.

Os *primers* foram desenhados a partir de sequências de DNA que correspondem a proteínas, identificadas em banco de dados, que fazem parte da rota da lignina e celulose, principais constituintes da fibra. Como algumas sequências encontradas foram de tamanho grande, foram desenhados mais de um par de *primer* para a mesma proteína, como no caso da alpha-galactosidase (ALFAGALAC01 e ALFAGALAC02), álcool cinâmico desidrogenase (CAD) (CAD01 e CAD02), endoglucanase (ENDO01, ENDO02 e ENDO03) e laccase (LACC01 e LACC02).

Ao analisar os géis, algumas bandas se destacam das demais, mostrando-se capazes de identificar cultivares de diferentes teores de fibra, dentre os genótipos avaliados.

No gel referente à proteína  $\alpha$ -galactosidase, *primer* ALFAGALAC01 (Figura 3) fica evidente duas bandas mais fortes na posição de 250pb para os genótipos CTC1 e CTC7, com baixo e médio teores de fibra respectivamente. Essas cultivares ficaram no mesmo grupo, de acordo com o dendrograma gerado.

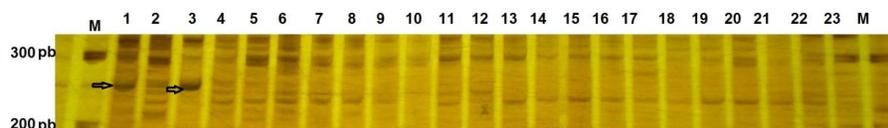


Figura 3 Polimorfismo genético em genótipos de cana-de-açúcar utilizando o *primer* ALFAGALAC1. 1 a 23 genótipos avaliados (1) CTC1; 2) CTC2; 3) CTC7; 4) CTC8; 5) CTC9; 6) CTC14; 7) CTC15; 8) CTC16; 9) RB925345; 10) RB861515; 11) RB935744; 12) RB855453; 13) RB835486; 14) RB925211; 15) SP81-3250; 16) SP80-1842; 17) RB72454; 18) SP83-2847; 19) SP89-1115; 20) SP84-2025; 21) SP91-1285; 22) *S. officinarum* e 23) *S. spontaneum*).M- marcador molecular (100bp).

No outro gel, para o *primer* ALFAGALAC02 (Figura 4) referente à mesma proteína, na mesma posição de 250pb, somente uma banda aparece na cultivar CTC7 (médio teor de fibra) se destacando dos demais. Assim, pode-se inferir que esta proteína seria um possível marcador molecular para a identificação da cultivar CTC. Como a proteína  $\alpha$ -galactosidase participa do crescimento das plantas, ela se destacou em uma cultivar que apresenta médio teor de fibra.

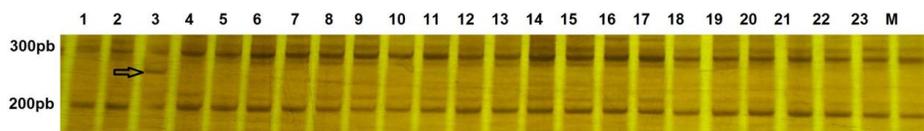


Figura 4 Polimorfismo genético em genótipos de cana-de-açúcar utilizando o *primer* ALFAGALAC02. 1 a 23 genótipos avaliados (1) CTC1; 2) CTC2; 3) CTC7; 4) CTC8; 5) CTC9; 6) CTC14; 7) CTC15; 8) CTC16; 9) RB925345; 10) RB861515; 11) RB935744; 12) RB855453; 13) RB835486; 14) RB925211; 15) SP81-3250; 16) SP80-1842; 17) RB72454; 18) SP83-2847; 19) SP89-1115; 20) SP84-2025; 21) SP91-1285; 22) *S. officinarum* e 23) *S. spontaneum*). M- marcador molecular (100bp).

Em análise do gel CAD01, referente à proteína álcool cinâmico desidrogenase, uma banda se destaca na posição de 350pb, para as cultivares CTC8, CTC15, SP80-1842, SP83-2847, SP84-2025 e SP91-1285, todas com médios e altos teores de fibra, classificando-as das demais para esta característica. Também se destaca a ausência de bandas, nesse gel, na posição de 500pb, nas cultivares CTC2, CTC7, CTC9, SP89-1115 e SP84-2025, com médio e alto teores de fibra, na sua maioria, separando, portanto, cultivares CTC e SP para essa característica. Como essa enzima catalisa e regula a lignificação, é de se esperar que esteja associada aos médios e altos teores de fibra.

Para a proteína endoglucanase (Figura 5), o não aparecimento de banda na posição de 380pb difere as espécies utilizadas como testemunhas no trabalho. Observa-se a ausência dessa banda para a espécie *S. spontaneum* (que apresenta alto teor de fibra) enquanto na *S. officinarum* ela se faz presente. Também se encontra ausente a banda nas cultivares CTC1, CTC2, CTC7, CTC8, CTC14, CTC16, RB935744, RB925211, RB72454 e SP83-2847, com médio e alto teores de fibra, com exceção da cultivar CTC1 que apresenta baixo teor. Também há distinção dentro das espécies na posição de 150 pb, onde uma banda se destaca na espécie *S. officinarum* (baixo teor de fibra) e na cultivar SP91-1285, que

apresenta 11,08% de fibra, sendo classificado como médio teor de fibra, porém pouco acima do considerado baixo teor de fibra (menor que 11%). Dessa forma, pode-se inferir que esse marcador destaca bandas em cultivares com baixos teores de fibra e estas se ausentam em cultivares com médio e alto teor de fibra, classificando os genótipos de interesse para essa característica. Isto se mostra verdade, na medida que a endoglucanase quebra as ligações de celulose, se ausentando portanto, nas cultivares com maiores teores de fibra.

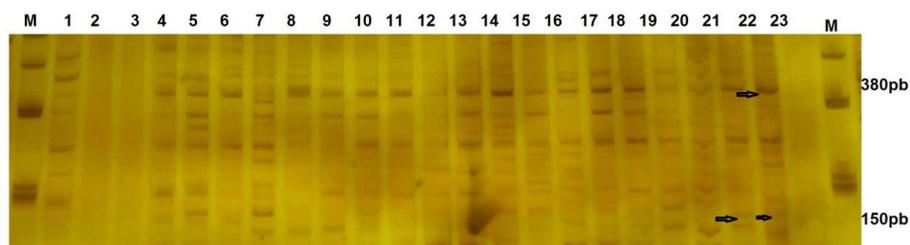


Figura 5 Polimorfismo genético em genótipos de cana-de-açúcar utilizando o *primer* ENDO1. 1 a 23 genótipos avaliados (1) CTC1; 2) CTC2; 3) CTC7; 4) CTC8; 5) CTC9; 6) CTC14; 7) CTC15; 8) CTC16; 9) RB925345; 10) RB861515; 11) RB935744; 12) RB855453; 13) RB835486; 14) RB925211; 15) SP81-3250; 16) SP80-1842; 17) RB72454; 18) SP83-2847; 19) SP89-1115; 20) SP84-2025; 21) SP91-1285; 22) *S. officinarum* e 23) *S. spontaneum*). M- marcador molecular (100bp).

Para a laccase e o *primer* LACC02 (Figura 6) também houve distinção entre as espécies utilizadas. Na posição de 150pb, houve ausência de banda na espécie *S. spontaneum* e também nas cultivares CTC14 e CTC15, todos com altos teores de fibra. Assim, esse *primer* também nos permite inferir que houve classificação das cultivares quanto à ausência de bandas para a característica alto teor de fibra. Como a laccase atua na degradação da lignina, já era de se esperar que esta tenha baixa expressão nas cultivares com alto teor de lignina.

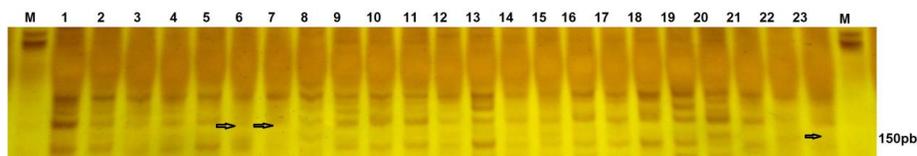


Figura 6 Polimorfismo genético em genótipos de cana-de-açúcar utilizando o *primer* LACC02. 1 a 23 genótipos avaliados (1) CTC1; 2) CTC2; 3) CTC7; 4) CTC8; 5) CTC9; 6) CTC14; 7) CTC15; 8) CTC16; 9) RB925345; 10) RB861515; 11) RB935744; 12) RB855453; 13) RB835486; 14) RB925211; 15) SP81-3250; 16) SP80-1842; 17) RB72454; 18) SP83-2847; 19) SP89-1115; 20) SP84-2025; 21) SP91-1285; 22) *S. officinarum* e 23) *S. spontaneum*). M- marcador molecular (100bp).

A ausência de bandas também foi o que se destacou quanto ao *primer* GLYCOSIL01 (Figura 7) desenhado para a proteína glycosiltransferase. Na posição de 110pb, esta não apareceu para as cultivares CTC15, RB935744 e RB855453, todas apresentando médio e alto teores de fibra. Houve também distinção entre as espécies na posição de 350 pb nesse mesmo gel, já que a banda não apareceu para a espécie *S. spontaneum* (alto teor de fibra) e as cultivares CTC8, CTC9, RB855453, RB835486, RB925211 e RB72454, todas também classificadas com médio e alto teores de fibra. Pode-se inferir que por meio desse marcador molecular consegue-se distinguir cultivares de médio e alto teor de fibra pela ausência de bandas.

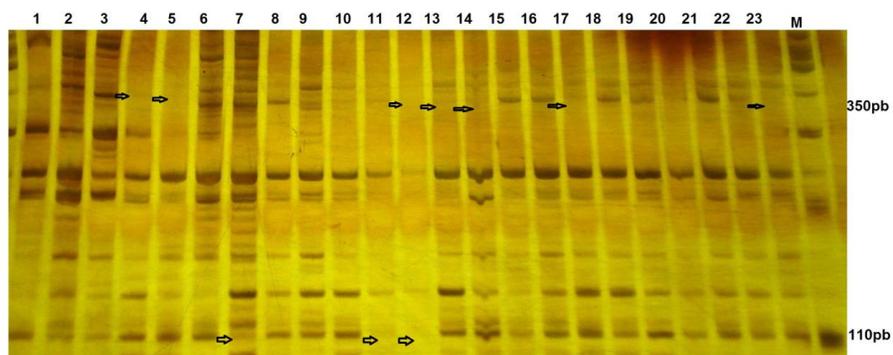


Figura 7 Polimorfismo genético em genótipos de cana-de-açúcar utilizando o *primer* GLYCOSIL01. 1 a 23 genótipos avaliados (1) CTC1; 2) CTC2; 3) CTC7; 4) CTC8; 5) CTC9; 6) CTC14; 7) CTC15; 8) CTC16; 9) RB925345; 10) RB861515; 11) RB935744; 12) RB855453; 13) RB835486; 14) RB925211; 15) SP81-3250; 16) SP80-1842; 17) RB72454; 18) SP83-2847; 19) SP89-1115; 20) SP84-2025; 21) SP91-1285; 22) *S. officinarum* e 23) *S. spontaneum*). M- marcador molecular (100bp).

Por último, o *primer* CHITI01, desenhado para a proteína chitinase, também se destaca pela diferenciação por ausência de bandas. Na posição de 150 pb, esta não aparece nas cultivares CTC8, CTC14, RB925345, RB867515, RB935744, RB855453, RB835486 e SP81-3250, todas classificadas como médio e alto teores de fibra, mostrando que esse marcador também pode ser usado para a classificação de cultivares com esta característica.

Embora não tenha sido possível indicar um marcador específico para as proteínas analisadas, pode-se verificar uma coerência entre os padrões dos géis e os agrupamentos gerados pelo coeficiente de Jaccard.

#### **4 CONCLUSÃO**

- Nenhum dos marcadores analisados pode ser usado como um padrão para identificação de teor de fibra em cana-de-açúcar.

## REFERÊNCIAS

ANONI, C. de O. Mapeamento de QTLs em progênie de irmãos-completos de cana-de-açúcar utilizando imputação múltipla. 100 p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2011.

ARRUDA, P. Sugarcane transcriptome: a landmark in plant genomics in the tropics. In: Arruda P (ed), Special volume on Sugarcane Transcriptome. **Genet. Mol. Biol.**, v. 24, 296 p. 2001.

FERNANDES, A. C. Cálculos na Agroindústria da cana de açúcar. Piracicaba, **STAB: Açúcar, Álcool e Subprodutos**, 193p. 2000.

FERREIRA, M. E.; GATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3.ed. Brasília: EMBRAPA, CENARGEN, 220p. 1998.

GUIMARÃES, V. M. et al. Characterization of  $\alpha$ -galactosidases from germinating soybean seed and their use for hydrolyses of oligosaccharides. **Phytochemistry**, v. 58, p. 67-73, 2001.

KIEDROWSKI, S; KAWALLECK, P; HAHLBROCK, K; SOMSSICH, I. E; DANGL, J. L. Rapid activation of a novel plant defense gene is strictly dependent on the *Arabidopsis RPM1* disease resistance locus. **EMBO J**, v. 11, p. 4677– 4684, 1992.

LEWIS, N. G.; SARKANEN, S. **Lignin and lignan biosynthesis**, American Chemical Society. Washington, DC, 436 p. 1998.

LOPES, F. C. da C. Mapeamento genético de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) por associação empregando marcadores SSR e AFLP. Tese (Genética e Melhoramento de plantas) para obtenção do título de doutor em Ciências. Universidade de São Paulo- Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 140 p., 2011.

MARQUES, M. O.; MARQUES, T. A, TASSO JUNIOR, L. C. **Tecnologia do açúcar: Produção e Industrialização da cana de açúcar**. Jaboticabal: FUNEP, 166p. 2001.

NCBI. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/UGOrg.cgi?TAXID=4547>>.

Acesso em: 26 out. 2011.

OGEDA, T. L.; PETRI, D. F. S. Hidrólise enzimática de biomassa. **Quim. Nova**, v. 33, n. 7, p. 1549-1558, 2010.

PATEL, A. K.; SINGH, V. K.; YADAV, R. P.; MOIR, A. J.; JAGANNADHAM, M. V. **Plant Mol. Biol.**, v. 71, p. 277, 2009.

RIPOLI, T. C. C.; RIPOLI, M. L. C. **Biomassa de cana-de-açúcar: colheita, energia e ambiente**. Piracicaba: Barros & Marques Ed. Eletrônica, 302 p. 2004.

ROZEN, S.; SKALETSKY, H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: KRAWETZ, S.; MISENER, S. (Ed.). **Bioinformatics methods and protocols: methods in molecular biology**. Totowa; Humana, p. 365-386. 2000.

SEGATO, S. V. et al. **Atualização em produção de cana-de-açúcar**. Piracicaba, 415p. 2006.

SOGI. Disponível em <[SaccharumofficinarumGeneIndex-http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/CGIbin/tgi/gimain.pl?gudb=s\\_officinarum](http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/CGIbin/tgi/gimain.pl?gudb=s_officinarum)>.  
Acesso em: 26 out 2011.

STUPIELLO, J. P. **Nitrogênio Qualidade da matéria prima e efeitos na fabrica**. STAB: Açúcar, Alcool e Subprodutos, Piracicaba, v.19, n. 4, p.13, Piracicaba, 2001.

TREFZER, A.; FISCHER, C.; STOCKERT, S.; WESTRICH, L.; KUNZEL, E.; GIRRESER, U.; ROHR, J.; BECHTHOLD, A. Elucidation of the function of two glycosyltransferase genes (lanGT1 and lanGT4) involved in landomycin biosynthesis and generation of new oligosaccharide antibiotics. **Chem. Biol.**, n. 8, v. 12, p. 1239-1252, 2001.

### **CAPÍTULO 3**

## **DIVERGÊNCIA GENÉTICA DE *SACCHARUM* spp. POR MEIO DE MARCADORES SSR**

## RESUMO

A caracterização de genótipos é importante tanto em bancos de germoplasma, em programas de melhoramento, quanto no registro de cultivares para a comercialização. Para a maioria das espécies, esta caracterização é feita por meio de marcadores morfológicos, porém esses marcadores apresentam algumas limitações para a distinção de genótipos de espécies que apresentam estreita base genética como a cana-de-açúcar, principalmente por sofrerem efeito do ambiente e pelo baixo grau de polimorfismo. Os marcadores moleculares SSR são uma alternativa para a identificação de genótipos de cana-de-açúcar por apresentarem ampla cobertura do genoma, resultando em elevado grau de polimorfismo. Este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar a divergência genética de cultivares e espécies de cana-de-açúcar do painel de acessos da Universidade Federal de Lavras, UFLA. Foram utilizados 13 *primers* para a caracterização de 21 cultivares e 2 espécies de cana-de-açúcar. Pelo dendrograma obtido a partir do coeficiente de Jaccard, foi possível detectar baixo polimorfismo a partir dos marcadores SSR. Os genótipos foram agrupados em quatro grupos, o que permitiu distinguir genótipos mais divergentes existentes no material estudado, que possam ser utilizados em programas de melhoramento da cana-de-açúcar.

**Palavras-chave:** Similaridade genética. Acessos de cana-de-açúcar. Marcadores SSR.

## ABSTRACT

Genotypic characterization is important, both in germplasm banks, in improvement programs, and in the record of cultivars for marketing purposes. For most species, this characterization is performed by morphological markers, but these markers have some limitations regarding genotype distinction for species that present a narrow genetic base, such as sugar cane, mainly for suffering the effect of the environment and for the low degree of polymorphism. SSR morphological markers are an alternative for the identification of sugar cane genotypes, for presenting a wide genome coverage, resulting in a high degree of polymorphism. This study was performed in order to evaluate the genetic diversity of cultivars and species of sugar cane in the access panel of Universidade Federal de Lavras, UFLA. 13 primers were used for the characterization of 21 cultivars and two species of sugar cane. Through the dendrogram obtained by the Jaccard coefficient, it was possible to detect a low polymorphism from SSR markers. The genotypes were grouped into four groups, which allowed to distinguish the most diverse existing genotypes in the studied material, which can be used in sugar cane improvement programs.

**Keywords:** Genetic similarity. Sugar cane accesses. SSR markers.

## 1 INTRODUÇÃO

Em instituições de pesquisa têm sido desenvolvidas novas cultivares de cana-de-açúcar resistentes a doenças, estresses abióticos e com altas produtividades, para atender à demanda do mercado nacional.

Para assegurar o direito do obtentor sobre a cultivar desenvolvida, foi aprovada no Brasil a Lei de Proteção de Cultivares (nº 9456 de 22 de julho de 1997) (BRASIL, 2003). Porém, para que uma cultivar seja lançada no mercado, ela não precisa ser protegida, mas deve estar, obrigatoriamente, inscrita no Registro Nacional de Cultivares.

Segundo Aguiar et al. (2004), marcadores morfológicos tem sido utilizados como descritores mínimos para a proteção e registro de cultivares. Porém, em espécies com estreita base genética, como a cana-de-açúcar, esses marcadores apresentam algumas limitações por serem influenciados pelo ambiente e por serem expressos somente nas plantas adultas (VIEIRA et al., 2010). Já os descritores de DNA apresentam a vantagem de representar todo o genótipo, mantendo consistência nos resultados, evitando o problema da expressão do fenótipo (WUNSCH; HORMAZA, 2002). Dessa forma, os marcadores moleculares do tipo microssatélites, ou SSR, seqüências simples repetidas, são uma alternativa para a diferenciação de cultivares de cana-de-açúcar, já que apresentam ampla cobertura do genoma (SAWPNA et al., 2011), sendo úteis também em estudos de divergência genética.

Estudos de divergência genética são importantes para o conhecimento da variabilidade genética das populações e possibilitam o monitoramento de bancos de germoplasma (CRUZ; CARNEIRO, 2003), pois geram informações úteis para a preservação e o uso dos acessos (TOQUICA et al., 2003).

A busca constante de novas cultivares por meio do melhoramento genético tem possibilitado a seleção de genótipos mais promissores e adaptados

às diversas condições edafoclimáticas do país (SIMÕES NETO et al., 1999). Com o desenvolvimento de novas cultivares, têm crescido, nas últimas décadas, o interesse pela caracterização de cultivares em todo o mundo, devido à necessidade de proteção de cultivares comerciais em um mercado econômico cada vez mais competitivo (MILACH, 1999).

A maioria das cultivares de cana-de-açúcar hoje plantadas são híbridos provenientes dos programas de melhoramento brasileiros que usam preferencialmente as cultivares nacionais como progenitores (BARBOSA, 2001). Assim, o uso generalizado de cultivares comerciais adaptadas ao sistema agrícola, na maioria das vezes oriundas de ancestrais muito próximos, com pequena distância genética entre si, pode levar ao estreitamento da base genética (ALMEIDA et al., 2005). Nesse contexto, o conhecimento da diversidade genética entre cultivares comerciais em programas de melhoramento de plantas é importante para os melhoristas na identificação e organização dos recursos genéticos disponíveis, visando a utilização destes na produção de novas cultivares promissoras (PALOMINO et al., 2005). Complementando esse entendimento, Silva et al. (2007) retratam que para a cana-de-açúcar, a estimativa da divergência genética entre diferentes genótipos vem sendo estudada, visando a seleção de genitores para formação de híbridos ou mesmo a formação de novas populações segregantes, oriundas do inter cruzamento de genótipos divergentes com características agronômicas superiores.

Objetivou-se com este trabalho avaliar a divergência genética de acessos de cana-de-açúcar do painel varietal da Universidade Federal de Lavras, UFLA.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Genética Molecular do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

### 2.1 Material vegetal

Foram avaliados 23 genótipos de *Saccharum* spp., sendo 21 cultivares comerciais e duas espécies (*S. officinarum* e *S. spontaneum*) provenientes do painel varietal da Universidade Federal de Lavras, MG.

As atuais plantas cultivadas de cana-de-açúcar (cultivares) são híbridos originados de cruzamentos interespecíficos envolvendo principalmente plantas de *S. officinarum* e *S. spontaneum*. A genealogia dos materiais está apresentada na Tabela 1.

Tabela 1 Identificação das 23 cultivares de cana-de-açúcar quanto aos genitores e procedência. UFLA, Lavras, MG.

Genótipos	Genitores	Procedência
CTC1	<b>LCP8110 x ?</b>	Centro de Tecnologia Canavieira, Brasil
CTC2	<b>SP82-1176 x ?</b>	Centro de Tecnologia Canavieira, Brasil
CTC7	<b>RTT8618 x ?</b>	Centro de Tecnologia Canavieira, Brasil
CTC8	<b>SP81-3493 x ?</b>	Centro de Tecnologia Canavieira, Brasil
CTC9	<b>SP81-3493 x ?</b>	Centro de Tecnologia Canavieira, Brasil
CTC14	<b>SP80-1842 x SP77-5181</b>	Centro de Tecnologia Canavieira, Brasil
CTC15	<b>SP84-2025 x ?</b>	Centro de Tecnologia Canavieira, Brasil
CTC16	Informações não obtidas	Centro de Tecnologia Canavieira, Brasil
RB925345	<b>H591966 x ?</b>	RIDESA, Brasil
RB861515	<b>RB72454 x ?</b>	RIDESA, Brasil
RB935744	<b>RB835089 x RB765418</b>	RIDESA, Brasil
RB855453	<b>TUC717 x ?</b>	RIDESA, Brasil
RB835486	<b>L6014 x ?</b>	RIDESA, Brasil

“Tabela 1, conclusão”

RB925211	<b>RB855206 x ?</b>	RIDESA, Brasil
SP81-3250	<b>CP701547 x SP71-1279</b>	São Paulo, Brasil
SP80-1842	<b>SP71-1088 x H575028</b>	São Paulo, Brasil
RB72454	<b>CP5376 x ?</b>	RIDESA, Brasil
SP83-2847	<b>HJ5741 x SP70-1143</b>	São Paulo, Brasil
SP89-1115	<b>CP731547 x ?</b>	São Paulo, Brasil
SP84-2025	<b>CO1007 x SP71-6180</b>	São Paulo, Brasil
SP91-1285	Informações não obtidas	São Paulo, Brasil
<i>S. officinarum</i>	<b>Espécie</b>	Oceania
<i>S. spontaneum</i>	<b>Espécie</b>	Ásia

\* ?: genitor desconhecido (policruzamento)

## 2.2 Marcadores SSR

Os marcadores moleculares foram encontrados na literatura (DUTRA FILHO, 2010) com suas respectivas temperaturas de anelamento, sendo eles MCSA176C01 R/F (38°C); SCCO1 R/F (50°C); MCSA175G03 R/F (38°C); SCB07 R/F (50°C); MCSA205C07 R/F (42°C); SCC04 R/F (50°C); SCA07 R/F (50°C); MCSA005C204 R/F (42°C); SCC05 R/F (62°C); SCA08 R/F (65°C); YCSA02047 R/F (38°C); SCA10 R/F (65°C) e YCSA24043 R/F (42°C).

As seqüências dos 13 *primers* encontrados na literatura estão apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2 Sequência (5'-3') dos locos microssatélites de *Saccharum* spp.

Loco	Sequência
MCSA17503	F: GTT TGA CAG GCG GAT GTT CTG A R: CCA TCG AGC AAT CGA GCT GC
SCC01	F: GAT GCT TGG GTC GTG ATT TC R: TCG CGT CCA CCA ATG AAC C
MCSA17601	F: CGA ACA GGT TAA AGC CCA TGT C R: GAG TCA GTT GGT GCC GAG ATT G
SCC07	F: ACG AGA ACC ACA GCC ACC AG R: GGA GGT AGT CGG TGA AGT GC
MCSA205C07	F: GCA CGG GCT AGA ACC TGG AAG G R: GCT ACC AGT TCT CGG TGC TTC
SCC04	F: GGG GAC CTG AAG ATG ACT GC R: TCC TGC CTG CCT CAT CAT AC
SCA07	F: CAG GAG TAT GAG CAA CAG AGC AG R: TTG CAA TGG AGG CGA AAC AC
MCSA005C04	F: CAT CCT CCA CGC ATC TGT TTT CCA R: AGT AGT CAC CAC CAT GTC TGG CA
SCC05	F: TCG TCT TCC TCC TCT TGC TCT GGT C R: CAT CCT CCT CTG CTG CTC TCG TCT C
SCA08	F: GCC GGA TCG CCA GGT AGA AGA AAC R: GGC AGG AGC GCG ACA AGC CG
YCSA02047	F: GCG TTT CCG ACC TGG ATA CC R: GCA GAG ACA GGC GTC TTC GTA CT
SCA10	F: TCT AAG CCA AGC CGA TTC CGT TC R: CAG CAG CCC AAC CCA CAG TCG
YCS24043	F: GAG GTT AGC GAA GTG GAT CAC G R: CCA AAG CCC AAC TGA AAG AGC

(DUTRA FILHO, 2010; PINTO et al., 2004)

### 2.3 Extração do DNA

As folhas foram coletadas da base de cada planta, pela manhã, ainda úmidas. Em seguida, foram armazenadas em sacos plásticos e colocadas em isopor com gelo para posterior extração do DNA, seguindo protocolo de Ferreira e Gattapaglia (1998) para extração de DNA.

As folhas foram maceradas em N<sub>2</sub> líquido até a obtenção de um pó bem fino. Após isso, foram adicionados, a 200 mg do tecido vegetal, 350 µL do tampão de extração CTAB 2% (CTAB 2%; 100 mM Tris-HCl pH 7,8; 20 mM

de EDTA pH 8,0; 1,4 mM NaCl; 2% de  $\beta$  mercaptoetanol) e incubados a 65°C, por 1 hora, homogeneizando a cada 15 minutos. Ao final deste período, resfriou-se as amostras por 5 minutos e foram adicionados 350  $\mu$ L de clorofórimo-álcool isoamílico (24:1) que foram homogeneizados por 25 minutos no agitador por inversão para obtenção de uma emulsão, que posteriormente foi centrifugada, por 10 minutos, a 14.000 rpm. Ao sobrenadante foram adicionados 250  $\mu$ L de isopropanol gelado e a emulsão foi misturada por inversão 5 vezes e acondicionada no freezer por 1 hora. Em seguida a emulsão foi centrifugada por 10 minutos, a 14.000 rpm. Em seguida, foi descartado o sobrenadante e adicionados 140  $\mu$ L de etanol 70% gelado para a precipitação do DNA, homogeneizando-se manualmente os tubos, que foram centrifugados a 14.000 rpm por 10 minutos. Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado, deixando os tubos secarem à temperatura ambiente até a completa evaporação da solução de etanol. Após a secagem, o pellet foi ressuscitado com 50  $\mu$ L de TE pH 8,0. Em seguida, foram adicionados 2  $\mu$ L de RNase (10 mg/mL) e as amostras foram incubadas, a 37°C, por 30 minutos.

O DNA foi quantificado por meio do espectrofotômetro Nano Vue e a sua qualidade foi avaliada e gel de agarose 0,7%.

## 2.4 Reações de PCR

As reações de amplificação tiveram volume final de 12,01  $\mu$ l, contendo, 10 ng de DNA, 0,2 mM de cada dNTP, 0,4 mM do oligonucleotídeo iniciador tampão de reação 1X, e 0,4 unidades de Taq polimerase. Em seguida as reações foram amplificadas em termociclador Eppendorf MasterCycler Gradiente 5331. Após a desnaturação inicial a 94°C por dois minutos, cada ciclo de amplificação correspondeu a: 94°C por 45 s, 15 s de anelamento (conforme a temperatura de cada par de *primers* identificada através de um gradiente de temperatura

variando de 50° C a 55° C) e alongação a 72° C por 30 s. Após 32 ciclos, procedeu-se a extensão final por 2 min a 72° C.

## 2.5 Análise dos locos SSR

Os produtos de amplificação foram separados em gel de poliacrilamida 8% imerso em tampão TBE (0,45 M de tris-borato, 0,01 M de EDTA pH 8,0) a 140 V durante 2 horas.

Decorrido este tempo, os géis foram tratados com solução de nitrato de prata a 0,2% e solução reveladora (NaOH). Após dez minutos de tratamento em cada solução, os produtos de amplificação foram visualizados em transluminador de luz branca e fotografados em câmara fotográfica.

Os produtos da amplificação, visualizados no gel, produzidos por cada *primer*, foram utilizados na elaboração de uma matriz de similaridade genética, por meio do registro da presença (1) e da ausência (0) de bandas no perfil eletroforético de cada genótipo. A estimativa da similaridade genética ( $S_{gij}$ ) entre cada par de genótipos foi calculada pelo coeficiente de Jaccard, representado pela seguinte expressão:

$$\text{Coeficiente de jaccard: } S_{gij} = \frac{a}{a + b + c},$$

sendo

a= presença de banda em ambos os genótipos i e j;

b= presença de banda no indivíduo i e ausência de banda no indivíduo j;

c= ausência de banda no indivíduo i e presença de banda no indivíduo j.

Com base no coeficiente de similaridade de Jaccard, os genótipos foram agrupados pelo Unweighted Pair-Group Method, ou UPGMA, utilizando-se o programa XLSTAT (Addinsoft®, versão 2011.2.04).

O índice de similaridade de Jaccard tem se mostrado bastante eficiente na análise de distâncias, pelo fácil entendimento e por comparar o número de presenças de bandas comuns e o número total de bandas envolvidas, excluindo o número de ausências conjuntas (MEYER, 2002).

O agrupamento do tipo UPGMA está entre os mais utilizados na análise de diversidade genética, sendo o método algorítmico mais simples e de fácil entendimento, onde as distâncias avaliadas possibilitam a construção de um dendrograma de similaridade ou dissimilaridade com grande conteúdo informativo (ARRIEL et. al., 2006).

Em seguida foi calculada a dissimilaridade, com o objetivo de representar o grau de divergência genética entre as diferentes cultivares. A dissimilaridade é um complemento da similaridade ( $Dis = 1 - Sim$ ), é um índice de divergência.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os 13 pares de *primers* selecionados para a análise de diversidade genética nos 23 genótipos de cana proporcionaram 183 produtos de amplificação, os quais forneceram uma média de 14,08 bandas por par de *primer*. O maior número de alelos foi registrado no primer MCSA005C2204 or meio do qual foram amplificados 18 alelos, seguidos pelo MCSA175G03, SCB07 e MCSA205C07 com amplificação de 17 alelos, enquanto o menor número ocorreu no MCSA176C01 com apenas oito alelos.

Os coeficientes de dissimilaridade de Jaccard (SSR) para todos os 23 genótipos variaram de 0,182 a 0,635. A menor dissimilaridade foi observada entre as cultivares RB855453 e RB835486 e a maior dissimilaridade genética entre RB867515 e *S. spontaneum*.

Um corte feito a 0,367 (média) separou os genótipos em quatro grupos, o primeiro grupo (cor verde) é formado pelas cultivares CTC 9, CTC 14, CTC 15, CTC 16 e RB925345; o segundo grupo (cor rosa) é formado pelas cultivares RB867515, RB935744, RB855453, RB835486, RB925211, SP81-3250, SP80-1842, RB72454, SP83-2847, SP89-1115, SP84-2025 e SP91-1285; o terceiro grupo (cor vermelha) é formado pelas cultivares CTC 2 e CTC 8 e o quarto e último grupo (cor azul) é formado pelas cultivares CTC 1, CTC 7 e as testemunhas *S. officinarum* e *S. spontaneum*.

Pela distribuição dos genótipos nos grupos observou-se baixa divergência genética entre eles (Figura 2).

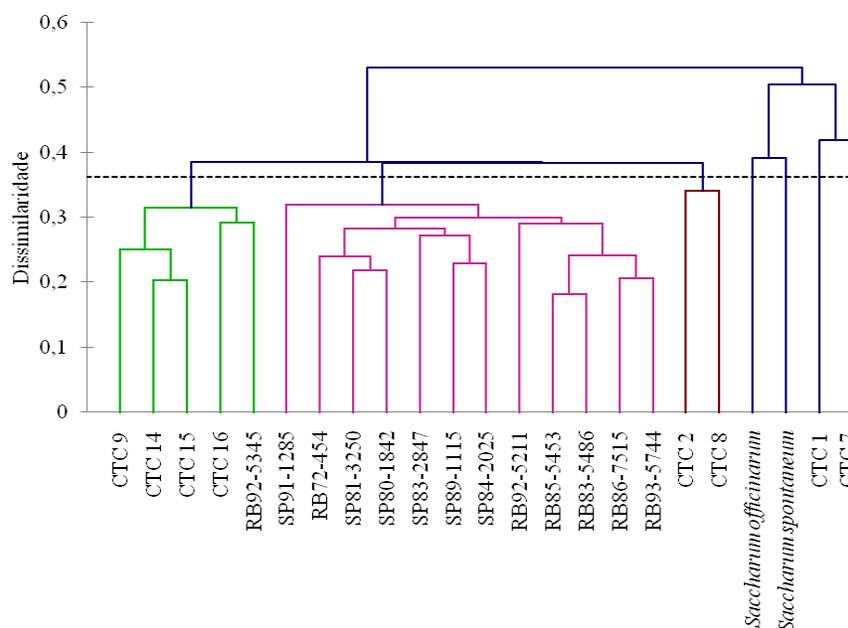


Figura 1 Dendrograma gerado pelo método UPGMA por meio da matriz de dissimilaridade de Jaccard, por *primers* SSR, entre acessos de *Saccharum* spp.

Pelo estudo da divergência genética entre as 21 cultivares de cana e as 2 espécies, obteve-se a menor dissimilaridade (0,182) entre RB855453 e RB835486, que encontram-se no mesmo grupo de acordo com o dendrograma, podendo ser explicada provavelmente por terem como genitores cultivares CP (Canal Point (EUA)). Já a maior (0,635) dissimilaridade genética foi observada entre RB867515 e *S. spontaneum* provavelmente pelo fato da espécie *S. spontaneum* não ser um ancestral comum da cultivar RB867515. *S. spontaneum* é considerada uma das espécies com maior diversidade genética dentre as espécies do gênero *Saccharum*, o que justifica a alta dissimilaridade do genótipo.

Os métodos de agrupamento têm por objetivo a reunião dos indivíduos em grupos de modo que haja homogeneidade (pouca divergência ou distância) dentro do grupo e heterogeneidade entre os grupos (grande divergência ou distância). O método UPGMA, fundamentado na dissimilaridade, possibilitou a distribuição dos 23 genótipos em quatro grupos distintos (Figura 1).

No grupo I foi englobada a maioria das cultivares CTC, todas provenientes de policruzamento.

No grupo II foram agrupadas somente cultivares RB e todas as cultivares do grupo SP. As cultivares RB867515 e RB72454 foram agrupadas dentre os genótipos do grupo II, já que possuem a mesma constituição genética, sendo que a cultivar RB72454 foi usada no cruzamento para a obtenção da RB867515.

Já as cultivares CTC 9 e CTC 8, apesar de possuírem o mesmo genitor feminino (SP81-3493), foram agrupados em diferentes grupos (I e III respectivamente). Este resultado pode ser atribuído a complexidade da herança genética na cana-de-açúcar que, sendo uma planta altamente heterozigótica, pode possuir alelos desfavoráveis que somente são expressos após algumas gerações de cruzamento entre indivíduos aparentados (FERREIRA et al., 2005b).

Esses resultados são comuns neste tipo de análise, em que os primeiros grupos concentram a maior parte dos indivíduos e os últimos grupos concentram menores números, a exemplo de outros trabalhos com diferentes culturas, como Sudre et al. (2005) com pimenta e pimentão e Barbosa (2001) com cana-de-açúcar. Porém, a alta porcentagem de indivíduos em apenas um grupo indica a baixa divergência encontrada, conforme estabelecem os autores citados. Dessa maneira, Ferreira et al. (2005b) mencionam que o uso de genitores com parentesco próximo pode estreitar a base genética trazendo perdas devido a depressão por endogamia.

O grupo III foi formado por duas cultivares CTC, ambas provenientes de genitores SP.

O grupo IV foi representado por duas cultivares CTC e as 2 espécies usadas como testemunhas (*S. spontaneum* e *S. officinarum*).

Usando outro tipo de marcadores molecular, Almeida et al. (2009) estudaram quatorze cultivares da série RB de cana-de-açúcar (RB943365, RB9364, RB931011, RB92579, RB863129, RB94503, RB931530, RB931003, RB961552, RB9622, RB961, RB951541, RB9629 e RB931611), utilizando trinta e sete *primers* de ISSR. A análise geral do agrupamento, gerado pelo método UPGMA, resultou na formação de seis grupos, sendo que um dos grupos também concentrou o maior número de cultivares. Isto sugere que genótipos distintos têm sido utilizados nos programas de melhoramento desenvolvidos pela RIDESA e que os marcadores ISSR são promissores no acesso da diversidade genética, tendo potencial para identificar marcadores cultivar-específicos em cana-de-açúcar.

Os resultados do presente trabalho inferiram haver uma base genética restrita, pois houve a formação de um grupo com grande número de genótipos, além do reduzido número de *primers* utilizados. Silva et al. (2005) ao estudarem a divergência genética de clones de cana-de-açúcar da série RB91 na terceira fase de seleção, também relataram existir base genética restrita, pois observaram um grupo com aproximadamente 83% dos genótipos avaliados; assim como Oliveira (2007), que analisou 80 famílias de irmãos germanos de cana-de-açúcar da série RB03 e verificou a formação de 18 grupos, com o primeiro constituído por 52,9% das famílias estudadas.

Nunes et al. (2011), objetivaram avaliar a segregação de marcadores microssatélites (SSR) em uma geração F1, proveniente do cruzamento de duas cultivares comerciais de cana-de-açúcar (RB97327 e RB72454), utilizando-se quinze pares de *primers* SSR. Foi possível verificar presença de polimorfismo

entre os genótipos provenientes do cruzamento das cultivares comerciais e para as combinações de *primers* SSR utilizadas. Foi observado também que *primers* SSR são capazes de gerar um grande número de marcas por genótipo em organismos poliplóides, como a cana-de-açúcar, sendo esta uma vantagem na construção de mapas genéticos.

Na cultura da cana-de-açúcar, Lopes (2007) utilizou outro tipo de agrupamento, o agrupamento de Tocher em três ambientes (Colorado, Paranavai e Iguatemi). O número de grupos de similaridade formados por esta metodologia variou de acordo com os diferentes ambientes estudados. Outro fator a ser mencionado é que o número de grupos formados foi relativamente pequeno, sendo que a maioria dos indivíduos (92 a 96%) permaneceu em apenas um grupo, enquanto um número reduzido de indivíduos (4 a 8%) formou os demais grupos, corroborando com o trabalho de Silva et al. (2011) e o presente trabalho.

Embora haja indícios de que há variabilidade genética entre os clones de cana-de-açúcar, o aumento desta por cruzamentos divergentes deve ser usado, pois esses podem aumentar as chances de encontrar clones superiores e evitar a depressão por endogamia, como os observados por Ferreira et al. (2005b). Esses autores encontraram valores positivos para a depressão em alguns caracteres; toneladas de Brix por hectare, toneladas de colmos por hectare, comprimento, diâmetro e peso médio de colmos, avaliando diferentes formas de cruzamento (policruzamento, autofecundação e cruzamentos bi-parentais). Segundo os mesmos autores, poucas pesquisas neste sentido têm sido realizadas nos programas de melhoramento genético de cana-de-açúcar no Brasil.

Dutra Filho (2013) avaliou a divergência genética em genótipos de cana-de-açúcar com base no polimorfismo gerado por meio de marcadores moleculares RAPD e SSR, utilizando-se o método hierárquico UPGMA. Segundo o autor, os iniciadores detectaram polimorfismo satisfatório e as técnicas multivariadas mostraram-se eficientes na identificação das progênies

mais divergentes no material genético considerado, indicando inclusive as progênies mais indicadas que podem resultar em novas combinações de alelos favoráveis com perspectivas de obtenção de indivíduos geneticamente superiores.

Com o objetivo de avaliar a divergência genética entre sete cultivares-padrão e onze clones RB de cana-de-açúcar, por meio de técnicas uni e multivariadas, com base em dez caracteres agroindustriais, Silva et al. (2011) concluíram que a metodologia multivariada permite identificar genótipos de maior divergência genética para utilização em programas de melhoramento da cana-de-açúcar e que os caracteres Pol % cana, toneladas de cana por hectare, brix % cana e altura de colmos foram os principais determinantes na quantificação da divergência genética.

Com base nos resultados obtidos pelo agrupamento neste trabalho, poderiam ser indicados cruzamentos entre os clones mais divergentes e mais produtivos, pois segundo Carpentieri-Pípolo et al. (2000), a identificação de genótipos com base somente na divergência sem considerar o seu desempenho, pode não ser uma boa alternativa, sendo recomendado o uso de indivíduos divergentes, mas com características agronômicas importantes.

Assim, o entendimento das relações genéticas do gênero *Saccharum* é muito complexo e o uso de marcadores moleculares não consegue informar com exatidão a quantidade mínima necessária para tal estudo, bem como as regiões do genoma por eles atingidos. Além disso, a poliploidia do genoma da cana contribui para as distorções observadas.

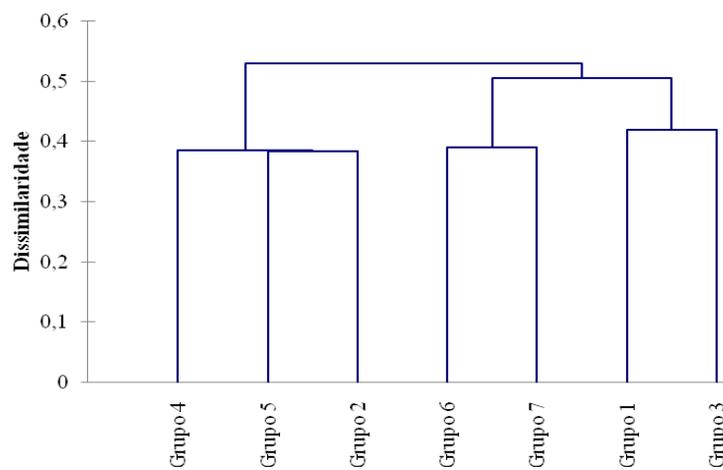


Figura 2 Dendrograma com as divisões dos grupos gerado pelo método UPGMA por meio da matriz de dissimilaridade de Jaccard, por *primers* SSR, entre acessos da coleção da UFLA.

#### **4 CONCLUSÕES**

- Há baixa divergência genética entre as cultivares do painel varietal da UFLA.
- As cultivares foram separadas em quatro grupos.

## REFERÊNCIAS

- AGUIAR, A. T. E. et al. Caracterização de cultivares de *Coffea arábica* mediante a utilização de descritores mínimos. **Bragantia**, Campinas, v. 63, n. 2, p. 179-192, abr. 2004.
- ALMEIDA, C. M. C. V.; DIAS, L. A. S.; OKABE, E. T.; MEDEIROS, J. R. P. Variability in genetic resources of cacao in Rondônia, Brazil. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.5, n.3, p.318-324, 2005.
- ALMEIDA, C. M. A.; LIMA, S. E. N. de; LIMA, G. S. de A.; BRITO, J. Z. de; DONATO, V. M. T. S.; SILVA, M. V. da. **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v. 33, Edição Especial, p. 1771 -1776, 2009.
- ARRIEL, N. H. C.; COSTA, M. M.; TREVISOLI, S. H. U.; MAURO, A. O. Outras aplicações dos marcadores. In: CAIXETA, E. T.; BORÉM, A. (Eds.). **Marcadores Moleculares**. Viçosa: UFV, 2006. p. 145-204.
- BARBOSA, M. H. P. Study of genetic divergence in sugarcane varieties grown in Brazil using the parentage coefficient. **International Sugar Journal**, v.103, n.1231, p. 294-295, 2001.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Ato nº.2, de 17 de janeiro de 2003. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 23 já. 2003. p. 2-3.
- CARPENTIERI-PIPOLO, V.; DESTRO, D.; PRETE, C. E. C.; GONZALES, M. G. N.; POPPER, I.; ZANATTA, S.; SILVA, F. A. M. Seleção de genótipos parentais de acerola com base na divergência genética multivariada. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.35, n.8, p. 1613-1619, 2000.
- CRUZ, C. D.; CARNEIRO, P. C. S. Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético. Viçosa, MG: Ed. da UFV, 2003. 585 p.

DUTRA FILHO, J de A. **Avaliação da variabilidade fenotípica e genética em genótipos de cana-de-açúcar utilizando marcadores moleculares RAPD e SSR.** 2010. 153 p. Dissertação (Mestrado em Melhoramento Genético)- Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2010.

DUTRA FILHO, J. A.; RESENDE, L. V.; BASTOS, G. Q.; SIMÕES NETO, D. E.; MACHADO, P. R. Utilização de marcadores moleculares RAPD e EST's SSR para estudo da variabilidade genética em cana-de-açúcar. **Rev. Ciênc. Agron., v.44, n.1, Fortaleza jan./mar., 2013.**

FERREIRA, F. M.; BARBOSA, M. H. P.; CASTRO, R. D.; PATERNELLI, L. A.; CRUZ, C. D. Effects of inbreeding on the selection of sugar cane clones. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Brasil, v.5 p. 174-182, 2005b.

FERREIRA, M. E.; GATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3.ed. Brasília: EMBRAPA, CENARGEN, 220p. 1998.

LOPES, V. R. Divergência genética entre clones de cana-de-açúcar da série RB97. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná. 87 f. Curitiba, 2007.

MEYER, A. S. Comparação de coeficientes de similaridade usados em análises de agrupamento com dados de marcadores moleculares dominantes. 106 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia- Estatística e Experimentação Agronômica)- Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade Federal de São Paulo, Piracicaba. 2002.

MILACH, S. C. K. Disponibilidade de técnicas moleculares para la caracterização varietal. In: PAGLIANO, D. (Coord.). **Calidad genética y sanitaria: um instrumento para la competitividad de la cadena agroindustrial.** Montevideo: IICA-PROCISUR, 1999. p. 39-46.

NUNES, C. de M. C.; COELHO, A. S. G.; MARTINS, A. C. F. da S.; SANTANA, J. R. O. de; SILVA, D. G.. **Detecção de polimorfismo em cana-de-açúcar utilizando marcadores SSR. 2011.**

OLIVEIRA, R. A. **Seleção de famílias de maturação precoce em cana-de-açúcar via REML/BLUP. 2007.** 142p. Tese (Doutorado)- Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

PALOMINO, E. C.; MORI, E. S.; ZIMBACK, L.; TAMBARUSSI, E. V.; MORAES, C. B. Genetic diversity of common bean genotypes of Carioca commercial group using RADP markers. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.5, n.1, p.80-85, 2005.

PINTO, L. R.; OLIVEIRA, K. M.; ULIAN, E. C.; GARCIA, A. A. F. G.; SOUZA, A. P de. Survey in the sugarcane expressed sequence tag database (SUCEST) for simple sequence repeats. **Genome**, v. 47, p 795-804, 2004.

SAWPNA, M.; SIVARAJU, K.; SHARMA, R. K.; SINGH, N. K.; MOHAPATRA, T. Single-Strand Conformational Polymorphism of EST-SSRs: A Potential Tool for Diversity Analysis and Varietal Identification in Sugarcane. **Plant Molecular Biology Reporter**, September , v. 29, n. 3, p. 505-513, 2011.

SILVA, C. M.; GONÇALVES-VIDIGAL, M. C.; FILHO, P. S. V.; SCAPIM, C. A.; DAROS, E.; SILVERIO, L. Genetic diversity among sugarcane clones (*Saccharum* spp.). **Acta Scientiarum Agronomy**, v.27, n.2, p.315-319, 2005.

SILVA, P. P.; SOARES, L.; RAMALHO NETO, C. E.; BARBOSA, G. V. S.; SANTOS, J. M. Diversidade genética em cana-de-açúcar baseada em caracteres morfoagronômicos e marcadores moleculares RAPD. In: Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas, 4., 2007, São Lourenço. Anais. São Lourenço: SBMP, 2007. CD Rom.

SILVA, G. C.; OLIVEIRA, F. J. de; ANUNCIACÃO FILHO, C. J. da; SIMÕES NETO, D. E.; MELO, L. J. O. T. de. Divergência genética entre genótipos de cana-de-açúcar. **Rev. Bras. Ciênc. Agrár.** Recife, v.6, n.1, p.52-58, 2011.

SIMÕES NETO, D. E.; MOREIRA, C. N.; LIMA, R. O. R.; MELO, L. J. O. T. Desempenho de genótipos de cana-de-açúcar (*Saccharum spp*) em diferentes ambientes do Estado de Pernambuco. In: CONGRESSO NACIONAL DA STAB, 7., 1999, Londrina, PR. **Anais...** Londrina, p. 29-33, 1999.

SUDRE, C. P.; RODRIGUES, R.; RIVA, E. M.; KARASAWA, M.; AMARAL JUNIOR, A. T. Divergência genética entre acessos de pimenta e pimentão utilizando técnicas multivariadas. **Horticultura Brasileira**, v.23, n.1, p. 22-27, 2005.

TOQUICA, S. P.; RODRÍGUEZ, F.; MARTINEZ, E.; DUQUE, M. C.; TOHME, J. Molecular characterization by AFLPs of *Capsicum* germplasm from the Amazon Department in Colombia, Characterization by AFLPs of *Capsicum*. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v.50, n.6, p.639-647, 2003. Crossref

VIEIRA, E. S. N. et al. Development, of microsatellite for identifying Brazilian *Coffea arabica* varieties. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 33, n. 3, p. 507-514, June 2010.

WUNSCH, A.; HORMAZA, J. I. Cultivar identification end genetic fingerprinting of temperate fruit tree species using DNA markers. **Euphytica**, Dordrecht, v. 125, p. 59- 67, 2002.

## ANEXOS

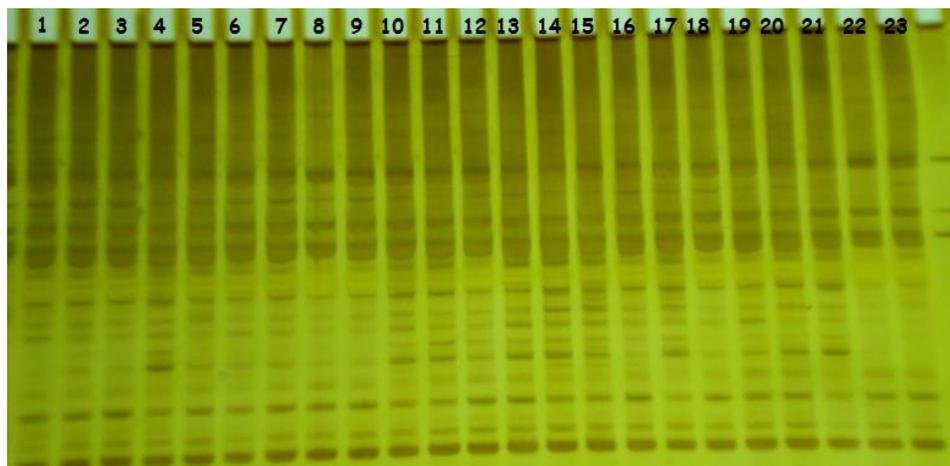


Figura 3 Detecção de polimorfismo genético em genótipos de cana-de-açúcar por meio de marcador microssatélite SCB07. 1 a 23 genótipos avaliados (1) CTC1; 2) CTC2; 3) CTC7; 4) CTC8; 5) CTC9; 6) CTC14; 7) CTC15; 8) CTC16; 9) RB925345; 10) RB861515; 11) RB935744; 12) RB855453; 13) RB835486; 14) RB925211; 15) SP81-3250; 16) SP80-1842; 17) RB72454; 18) SP83-2847; 19) SP89-1115; 20) SP84-2025; 21) SP91-1285; 22) *S. officinarum* e 23) *S. spontaneum*).