

# **AVALIAÇÃO DA VARIABILIDADE GENÉTICA EM VARIEDADES DE CANA-DE-AÇÚCAR POR MEIO DE *TARGET REGION AMPLIFICATION POLYMORPHISM* (TRAP).**

KLAUS A. G. ACCORONI<sup>1</sup>; CRISTIANE A. ANANIAS<sup>2</sup>; MATHEUS C. CARVALHO<sup>3</sup>;  
VICENTE E. ROSA JÚNIOR<sup>4</sup>; LUCIANA R. PINTO<sup>5</sup>; SILVANA CRESTE<sup>6</sup>.

Nº 0700016

## **Resumo**

Este trabalho, por meio da técnica *Target Region Amplification Polymorphism* (TRAP) que usa ferramentas de bioinformática e etiquetas de seqüências expressas (ESTs) para gerar marcadores polimórficos ao redor de seqüências de genes candidatos, tem o objetivo de estimar a similaridade genética entre 59 genótipos de cana-de-açúcar dentre os quais estão muitas variedades comerciais. Nove combinações de primers fixo/aleatório foram utilizadas, entre os primers fixos temos Sacarose Sintase, Sacarose Fosfato Sintase, Invertase Ácida Solúvel e um transportador de açúcar, e os arbitrários são três desenvolvidos por Li & Quiros (2001). Essas combinações geraram 145 fragmentos polimórficos, sendo combinação invertase ácida solúvel/arbitrário2 (32 fragmentos) e o menor com a combinação Sacarose fosfato sintase/arbitrário1 (6 fragmentos).

## **Abstract**

This work, through the technique *Target Region Amplification Polymorphism* (TRAP) that uses Bioinformatic tools and expressed sequences tag (ESTs) to generate polymorphic markers around sequences of genes candidates, has the objective of esteeming the genetic similarity among 59 sugarcane genotypes among which are many commercial varieties. Nine combinations of primers fixed /arbitrary were used. Among the fixed primers, there are Sucrose Synthase, Sucrose Phosphate Synthase, Acid Soluble Invertase and a transporter of sugar, and the arbitrary ones are three developed by Li & Quiros (2001). Those combinations have generated 145 polymorphic fragments, being combination Acid Soluble Invertase /arbitrary2 (32 fragments) and the smallest with the combination Sucrose Phosphate Synthase/arbitrary1 (6 fragments).<sub>1</sub>

---

1. Bolsista PIBIC; Graduação em Ciências Biológicas, FFCLRP/USP, Ribeirão Preto - SP, klausbio@hotmail.com

2. Mestranda em Genética, UNESP, Jaboticabal - SP.

3. Graduação em Ciências Biológicas, FFCLRP/USP, Ribeirão Preto - SP

4. PQ1, Recursos Genéticos Vegetais, Centro de Cana - IAC, Ribeirão Preto - SP

5. PQ1, Recursos Genéticos Vegetais, Centro de Cana - IAC, Ribeirão Preto - SP

6. Orientador: PQ1, Centro de Cana – IAC, Ribeirão Preto - SP

## Introdução

O Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) é pioneiro no Brasil no melhoramento genético da cana-de-açúcar, e nos últimos anos, mantém uma posição de destaque dentro do setor sucroalcooleiro, por meio do fornecimento de novas variedades desenvolvidas para as diferentes regiões produtoras do Estado de São Paulo. A seleção dos genitores tem sido baseada em caracteres agrônômicos e dados de genealogia, com cruzamentos biparental entre variedades elite. Entretanto, a falta de dados de genealogia e a caracterização deficiente dos clones dificultam prever as estimativas da diversidade genética. Além disso, a seleção contínua para as mesmas características resulta numa redução da diversidade genética, e comprometem os avanços no melhoramento genético.

Marcadores moleculares têm sido utilizados na estimativa de distâncias genéticas entre genótipos de cana-de-açúcar. No entanto, grande parte da informação obtida com marcadores moleculares na caracterização do germoplasma é oriunda de polimorfismos em regiões do genoma detectadas por marcadores randômicos. Para ter maior significado prático, as medidas de diversidade genética deveriam ser baseadas em genes funcionalmente caracterizados ou genes alvos, pois refletem polimorfismos funcionais. Assim, aumenta-se a probabilidade de que a variabilidade observada pelos marcadores reflita diferenças fenotípicas. Hu & Vick [1] propuseram a técnica *Target Region Amplification Polymorphism* (TRAP), a qual usa ferramentas de bioinformática e etiquetas de seqüências expressas (ESTs) para gerar marcadores polimórficos ao redor seqüências de genes candidatos. O polimorfismo é gerado a partir da combinação de um *primer* fixo, desenhado a partir de uma seqüência EST de interesse, e um *primer* arbitrário, gerando um padrão de bandas semelhante a AFLP.

Por meio de TRAP, este trabalho objetiva avaliar o polimorfismo genético existente em genes candidatos envolvidos no metabolismo de sacarose em genótipos de cana-de-açúcar, com o intuito de contribuir para a seleção dos genótipos mais promissores para os ensaios de hibridação do programa de melhoramento do IAC.

## Materiais e Métodos

*Material vegetal:* Uma coleção de 59 genótipos, representando os principais genitores utilizados no programa de melhoramento do Centro de Cana – IAC, foi escolhida para análise.

*Primers fixos:* foram utilizados quatro *primers* fixos, de 18 bases, desenhados a partir dos genes candidatos codificando para Sacarose Sintase (SYSY), Sacarose Fosfato Sintase (SPS), Invertase Ácida Solúvel (SAI) e um transportador de açúcar (SUT).

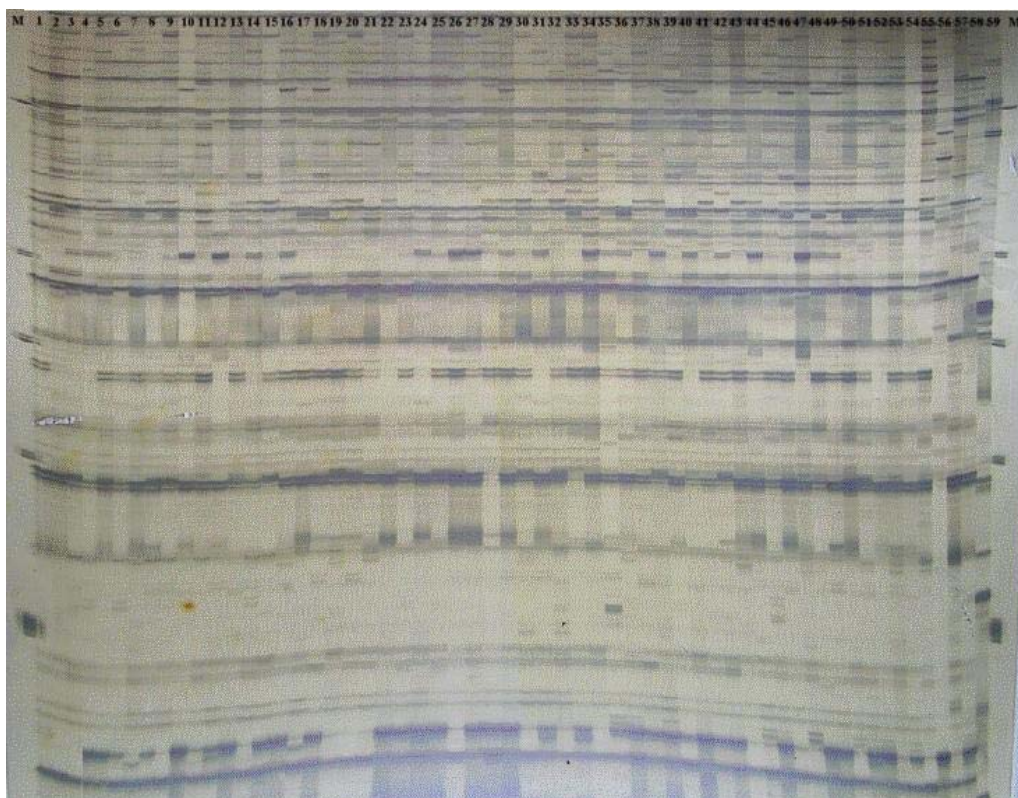
*Primers arbitrários:* três *primers* arbitrários, referidos como A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> e A<sub>3</sub>, de 18 bases, desenvolvidos por Li & Quiros [1] foram utilizados em combinação com os *primers* fixos.

*Extração do DNA, condições da PCR e detecção do polimorfismo:* DNA total de cada genótipo foi obtido segundo a metodologia proposta por Al-Janabi *et al.* [2]. Reações de amplificação foram conduzidas em termociclador BIO-RAD modelo MyCycler™, em volume de 13uL contendo tampão de amplificação 1X, 60 ng de DNA, 200uM de cada dNTP, 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,8uM do primer fixo, 0,8 uM primer arbitário, 0,5 unidade de *Taq* DNA polimerase (Biotools B&M Labs, S.A.). O ciclo de amplificação constou de desnaturação inicial 94°C 2 min, 5 ciclos de 94°C 45 s, 35°C 45 s, 72°C 1 min, seguidos de 35 ciclos a 94°C 45 s, 50°C 45 s, 72°C 1 min, com extensão final de 72°C por 7 min. A eletroforese foi conduzida em géis de sequenciamento, e o polimorfismo visualizado por meio da coloração com prata, segundo metodologia proposta por Creste *et al* [3].

Os dados foram analisados com presença (1) e ausência (0) para cada fragmento amplificado nos 59 genótipos. A similaridade genética entre os genótipos foi estimada utilizando-se o coeficiente de Jaccard (NTSYS - Numerical Taxonomy and Systematics, 2.1). A partir da matriz gerada, foi realizado o agrupamento dos genótipos pelo método UPGMA (Unweighted Pair Group Method) e os resultados apresentados em fenograma.

## **Resultados e Discussão**

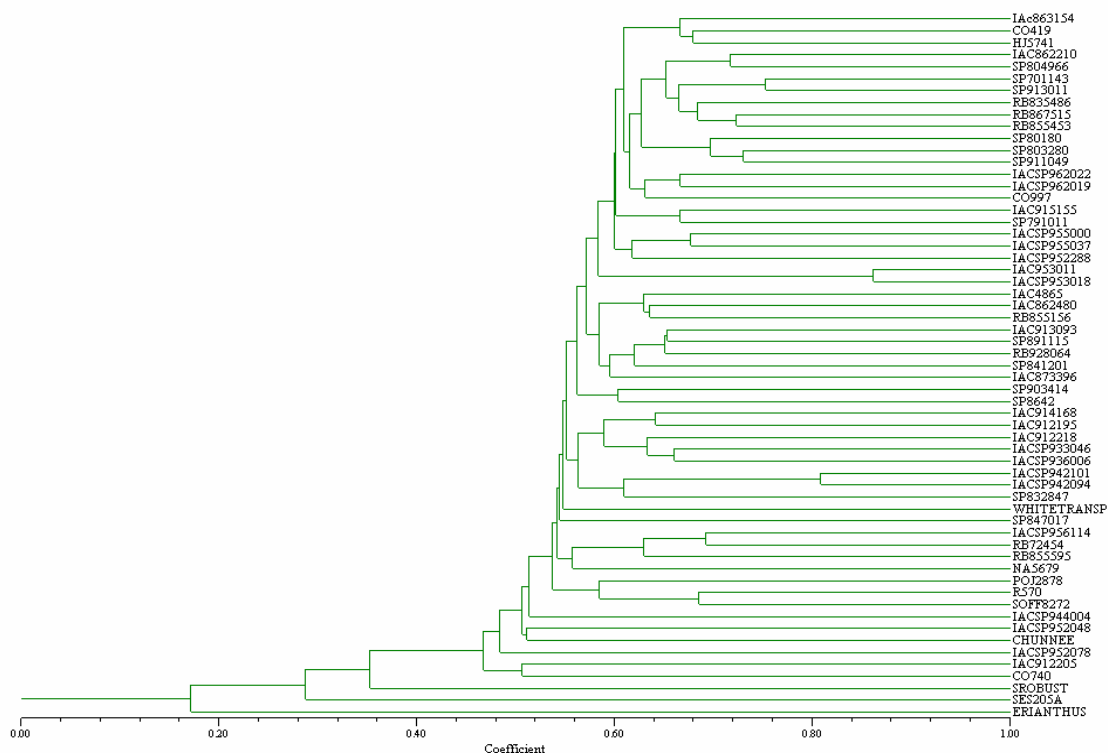
Nove combinações de *primers* fixo/arbitário foram utilizadas, as quais geraram 145 fragmentos polimórficos. A média de fragmentos polimórficos obtidos foi de 16,2 fragmentos por gel, sendo que o maior polimorfismo obtido com a combinação invertase ácida solúvel/arbitário2 (32 fragmentos) e o menor com a combinação Sacarose fosfato sintase/arbitário1 (6 fragmentos). Exemplo do polimorfismo é apresentado na Fig. 1.



**Figura 1** – Polimorfismo genético observado com marcadores TRAP na coleção de germoplasma a partir da combinação de primers SUT/A<sub>2</sub>.

Conforme pode ser observado no fenograma da Fig. 2, houve a formação de um grande grupo, contendo as variedades comerciais, os representantes de *S. officinarum* e *S. barberi* (Chunnee). Os acessos SES 205A de *Saccharum spontaneum* e *Saccharum robustum* mantiveram-se isolados, como também, o representante do gênero *Erianthus*, suportando a classificação taxonômica. O fato das variedades agruparem-se com os representantes de *S. officinarum* revela a estreita relação existente entre esses genótipos quando comparados à *S. spontaneum*. As variedades modernas de cana-de-açúcar são oriundas do cruzamento interespecífico entre *S. officinarum* (cana nobre, produtora de açúcar) e *S. spontaneum* (produz pouco açúcar, mas apresenta perfilhamento abundante, e é tolerante a estresses bióticos e abióticos), seguido de uma série de cruzamentos com *S. officinarum*, num processo denominado nobilitação. Dentro do grande grupo, não foi possível agrupar distintamente genótipos de alto e baixo teor de sacarose. No entanto, os dados parecem sugerir que a estratégia do uso de genes candidatos pode ser útil para se planejar cruzamentos para características específicas. Por exemplo, os genitores da população de mapeamento do CTC (SP80-180 e SP 80-4966) estão em subgrupos distintos, e apresentam uma similaridade genética ao redor de 60% para os genes do metabolismo de sacarose. Essa população apresenta segregação para sacarose. Por outro lado, os genitores da população de mapeamento do Centro de Cana (IACSP93-3046 e IACSP95-

3018), apresentam-se mais próximos, com similaridade ao redor de 80%, e provavelmente, essa população apresenta menor segregação para sacarose. As análises tecnológicas que estão sendo conduzidas nesta população permitirão elucidar essa observação. Direcionar cruzamentos com base em distâncias genéticas para caracteres específicos poderá ser uma estratégia interessante no programa de melhoramento.



**Figura 2** - Fenograma exibindo as relações filogenéticas em cana-de-açúcar a partir do polimorfismo de genes do metabolismo de açúcar.

## Referências

- HU, J.; VICK, B.A. 2003. Target region amplification polymorphism: a novel marker technique for plant genotyping. *Plant Molecular Biology Reporter*, n. 21, p.289-294.
- AL-JANABI; S.M., FORGET; L. DOOKUN, A. 1999. An improved and rapid protocol for the isolation of polysaccharide- and polyphenol-free sugarcane DNA. *Plant Molecular Biology Reporter*, n.17, p.1-8.
- CRESTE, S.; TULMANN-NETO, A.; FIGUEIRA, A. 2001. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gel by silver staining. *Plant Molecular Biology Reporter*, n.19, p. 299-306.