



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS – UFGD**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E AMBIENTAIS – FCBA**  
**CURSO DE BIOTECNOLOGIA**

**PRISCILA CARVALHO DA SILVA**

**REAÇÃO DE GENÓTIPOS DE CANA-DE-AÇÚCAR EM RESPOSTA AO**  
***SPORISORIUM SCITAMINEUM***

**DOURADOS**  
**MATO GROSSO DO SUL**  
**2016**

**REAÇÃO DE GENÓTIPOS DE CANA-DE-AÇÚCAR EM RESPOSTA AO  
*SPORISORIUM SCITAMINEUM***

Priscila Carvalho da Silva

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>: Livia Maria Chamma Davide

Co-orientador: Prof<sup>º</sup> Dr<sup>º</sup> Elias Alberto Gutierrez Carnelossi

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado a Universidade Federal  
da Grande Dourados para a  
obtenção do título de Bacharel em  
Biotecnologia.

DOURADOS  
MATO GROSSO DO SUL

2016

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).**

S586r	<p>Silva, Priscila Carvalho da.</p> <p>Reação de genótipos de cana-de-açúcar em resposta ao <i>sporisorium scitamineum</i>. / Priscila Carvalho da Silva. – Dourados, MS : UFGD, 2016.</p> <p>53f.</p> <p>Orientadora: Prof. Dra. Livia Maria Chamma Davide.</p> <p>Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biotecnologia) – Universidade Federal da Grande Dourados.</p> <p>1. <i>Saccharum officinarum</i> L. 2. <i>Sporisorium scitamineum</i>. 3. Inoculação. I. Título.</p>
-------	---

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central – UFGD.**

**©Todos os direitos reservados. Permitido a publicação parcial desde que citada a fonte.**

**REAÇÃO DE GENÓTIPOS DE CANA-DE-AÇÚCAR EM REPOSTA AO  
*SPORISORIUM SCITAMINEUM***

Por:

Priscila Carvalho da Silva

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como parte dos requisitos exigidos para  
obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Aprovado em:    /    /

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Livia Maria Chamma Davide

Orientadora – UFGD/FCA

---

Prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> Elias Alberto Gutierrez Carnelossi

Membro da Banca – UFGD/FCA

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Jackeline Matos do Nascimento

Membro da Banca – UNIGRAN

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Liliam Silvia Candido

Membro da Banca – UFGD/FCBA

*Nenhum obstáculo é tão grande, se sua vontade de vencer for maior!*

***Dedico***

*À Deus e a nossa senhora Aparecida.*

*Aos meus pais, Sueli Nascimento Carvalho Silva e José Carlos da Silva, por terem dedicado suas vidas a me criarem e não medirem esforços para que eu pudesse concluir essa fase. Nunca terei palavras para agradecer tamanho amor, esforço e dedicação.*

*A todos de minha família, o apoio de vocês foi essencial nessa caminhada.*

*Mãe, obrigada por sempre interceder por mim em suas orações!*

**AGRADECIMENTOS**

À Deus pela oportunidade, por me dar forças em todos os momentos e me possibilitar concluir esta caminhada.

Aos meus pais, por me apoiarem incondicionalmente, por respeitarem minhas decisões, por serem o meu maior exemplo de vida.

À Universidade Federal da Grande Dourados, em especial ao curso de Biotecnologia.

Ao Centro de Biotecnologia e melhoramento de Cana-de-açúcar da UFGD.

A todos os professores que fizeram parte de minha jornada acadêmica, e compartilharam de seus conhecimentos.

Em especial a minha orientadora Lívia Maria Chamma Davide, pelo comprometimento, paciência e dedicação. Por compartilhar de seus conhecimentos, pelos puxões de orelha, pelas palavras amigas e apoio, por tudo o que contribuiu em minha vida acadêmica e em meu crescimento pessoal. A senhora meus sinceros agradecimentos e grande admiração. Os momentos partilhados ficarão sempre em minha lembrança.

Ao professor Elias Alberto Gutierrez Carnelossi, profissional e pessoa maravilhosa. Por nunca ter medido esforços em repassar seus conhecimentos, pelas inúmeras vezes que me motivou, pelo tempo disponibilizado, por todos os ensinamentos. Não há palavras que possam descrever meu apreço e gratidão, que Deus prepare um caminho abençoado em sua jornada. Obrigada por todo o aprendizado que me proporcionou.

A professora Liliam Silvia Candido, por me acolher desde o primeiro ano da graduação, por ter me proporcionado ensinamentos incontáveis, sendo uma profissional e amiga incrível. Pessoa na qual pra sempre vou me espelhar. Obrigada por tudo.

A Jackeline Matos do Nascimento, por ser uma excelente profissional, pelo empenho que realiza suas atividades, por nunca ter hesitado em me ajudar, por todos os conselhos, por tudo o que contribuiu para este trabalho. Deixo aqui a minha admiração e meu obrigada.

Ao professor Leonardo de Oliveira Seno e ao amigo Emanuel Sanches Martins, pelo apoio e tempo disponibilizado para me ajudar nas análises estatísticas do trabalho.

A segunda família que a faculdade me proporcionou, em especial a Ana Caroline Fagundes, Natany Silva, Uliana Alves, que levarei por toda a vida.

A minha amiga de longa data, Simoni Santos, pelo apoio em minhas tarefas e amizade incondicional. A minha tia Telma Carvalho e ao meu primo Augusto Carvalho, por todo o auxílio, sou muito grata a vocês por tudo.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho, e em minha graduação.

Deixo aqui registrada minha gratidão a todos vocês.

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1

- Figura 1.** Climograma representativo dos dados meteorológicos coletados em campo segundo a estação climatológica da Embrapa Agropecuária Oeste (CPAO) de Dourado/MS, nos períodos de avaliações dos genótipos de setembro à janeiro de 2015/2016..... 17
- Figura 2.** Toletes de 4 genótipos de cana-de-açúcar em copos descartáveis com substrato, composto por areia grossa (30%) e terra de barranco (70%), em casa de vegetação da FAECA-UFGD..... 18
- Figura 3.** Inoculação de suspensão de teliósporos de *Sporisorium scitamineum* nas gemas de cana-de-açúcar, em casa de vegetação da FAECA/UFGD..... 19
- Figura 4.** Plântulas de cana-de-açúcar com 45 dias após plantio, em casa de vegetação da FAECA-UFGD..... 19
- Figura 5.** Número médio do total de touceiras (NTT), de 4 genótipos de cana-de-açúcar, avaliados ao longo do tempo (30 à 165 dias)..... 27
- Figura 6.** Número médio do total de perfilhos (NTP), de 4 genótipos de cana-de-açúcar, avaliados ao longo do tempo (30 à 165 dias)..... 28
- Figura 7.** Número médio de plantas doentes (NPD), de 4 genótipos de cana-de-açúcar, avaliados ao longo do tempo (30 à 165 dias)..... 29
- Figura 8.** Número médio do total de chicotes (NTC), de 4 genótipos de cana-de-açúcar, avaliados ao longo do tempo (30 à 165 dias)..... 30

### CAPÍTULO 2.

- Figura 1.** Imagem de gel de agarose submetido a eletroforese do DNA genômico de cana-de-açúcar, utilizando o protocolo 1. De 1 a 10 amostras de *Saccharum officinarum*, 11 DNA ladder ruller..... 39
- Figura 2.** Imagem de gel de agarose submetido a eletroforese do DNA genômico de cana-de-açúcar, utilizando o protocolo 2 com adaptações. De 1 a 10 amostras de *Saccharum officinarum*, 11 DNA ladder ruller..... 41

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 1.

- Tabela 1.** Dados meteorológicos obtidos de acordo com a estação climatológica da Embrapa Agropecuária Oeste (CPAO) – Dourados/MS, no período de fevereiro à abril de 2015..... 16
- Tabela 2.** Reação de resistência ao carvão de 4 genótipos de cana-de-açúcar, sendo, Variedade C: resistente; clone A: susceptível; variedade A: indefinida; variedade B: susceptível ..... 18
- Tabela 3.** Teste de esfericidade de Mauchly, para número total de touceiras (NTT), número de plantas doentes (NPD), número total de perfilhos (NTP) e número total de chicotes (NTC), em 4 genótipos de cana-de-açúcar no ano de 2015/2016 em Dourados-MS..... 23
- Tabela 4.** Resumo das análises de variância, para número total de touceiras (NTT), número de plantas doentes (NPD), número total de perfilhos (NTP) e número total de chicotes (NTC), em 4 genótipos de cana-de-açúcar no ano de 2015/2016 em Dourados-MS..... 24
- Tabela 5.** Estimativas das variâncias fenotípica ( $\hat{\sigma}_f^2$ ), variância de ambiente ( $\hat{\sigma}_a^2$ ), variância genética ( $\hat{\sigma}_g^2$ ), herdabilidade média no sentido amplo ( $h^2_a$ ), coeficiente de variação genético ( $C\hat{V}_g$ ), coeficiente de variação ambiental ( $C\hat{V}_a$ ), e a razão entre os coeficientes de variação genético e de ambiente ( $C\hat{V}_g/C\hat{V}_a$ ), obtidos para os componentes número total de touceiras (NTT), número de plantas doentes (NPD), número total de perfilhos (NTP) e número total de chicotes (NTC), em 4 genótipos de cana-de-açúcar no ano de 2015/2016 em Dourados-MS..... 25
- Tabela 6.** Comparação entre médias, para número total de touceiras (NTT), nos tempos de avaliações de 30, 60, 90, 120 e 165 dias, em 4 genótipos de cana-de-açúcar no ano de 2015/2016 em Dourados-MS..... 26
- Tabela 7.** Comparação entre médias, para número total de perfilhos (NTP), nos tempos de avaliações de 30, 60, 90, 120 e 165 dias, em 4 genótipos de cana-de-açúcar no ano de 2015/2016 em Dourados-MS..... 28

**Tabela 8.** Comparação entre médias, para número de plantas doentes (NPD), nos tempos de avaliações de 30, 60, 90, 120 e 165 dias, em 4 genótipos de cana-de-açúcar no ano de 2015/2016 em Dourados-MS..... 30

**Tabela 9.** Comparação entre médias, para número total de chicotes (NTC), nos tempos de avaliações de 30, 60, 90, 120 e 165 dias, em 4 genótipos de cana-de-açúcar no ano de 2015/2016 em Dourados-MS..... 31

## **CAPÍTULO 2**

**Tabela 1.** Quantidades em porcentagem de amostras extraídas, referentes as médias das quantificações de DNA ( $\eta\text{g}/\mu\text{l}$ ) genômico de cana-de-açúcar, determinadas através das leituras de absorbância sobre luz UV e A260/A280..... 42

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO 1. REAÇÃO DE GENÓTIPOS DE CANA-DE-AÇÚCAR EM RESPOSTA AO <i>SPORISORIUM SCITAMINEUM</i>.....</b>	<b>9</b>
1- INTRODUÇÃO .....	10
2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	10
2.1 Aspectos gerais da cultura da cana-de-açúcar.....	11
2.2 Fungo <i>Sporisorium scitamineum</i> na cana-de-açúcar .....	12
2.2.1 Teste de resistência dos genótipos .....	13
2.3 Melhoramento de cana-de-açúcar .....	14
3 - MATERIAL E MÉTODOS.....	16
3.1 - Inoculação do fungo <i>Sporisorium scitamineum</i> e plantio da cana-de-açúcar.....	16
3. 2 – Avaliação dos genótipos .....	16
3.3 - Análise estatística.....	20
4 - RESULTADO E DISCUSSÃO.....	23
5 - CONCLUSÃO.....	32
<b>CAPÍTULO 2. OTIMIZAÇÃO DE PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE DNA DE TECIDO FOLIAR DA CANA-DE AÇÚCAR.....</b>	<b>33</b>
1 – INTRODUÇÃO.....	34
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	35
2.1 - A biotecnologia e o uso de marcadores moleculares na cana-de-açúcar.....	35
2.2 – Extração de DNA.....	35
3 - MATERIAL E MÉTODOS.....	36
4 – RESULTADO E DISCUSSÃO.....	39
5 – CONCLUSÃO.....	42

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	43
ANEXOS.....	51

SILVA, P.C. CAPÍTULO 1: REAÇÃO DE GENÓTIPOS DE CANA-DE-AÇÚCAR AO *SPORISORIUM SCITAMINEUM* 2016. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biotecnologia) – Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados/MS.

## RESUMO

A cana-de-açúcar, *Saccharum officinarum*, é um dos principais produtos agrícolas do Brasil. O país ocupa o primeiro lugar no ranking mundial de produção e exportação de açúcar e etanol, sendo Mato Grosso do Sul um dos grandes produtores. O carvão é uma das doenças mais importantes da cultura, podendo causar perdas de até 100% da produtividade. Uma das formas de evitar os danos causados pelo fungo *Sporisorium scitamineum* na cana-de-açúcar, pode ser dada pela adoção de cultivares tolerantes/resistentes. Isto pode ser alcançado por meio de programas de melhoramento genético, utilizando técnicas de inoculação e avaliação da doença sob os genótipos. Neste aspecto, este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de quantificar a doença do *Sporisorium Scitamineum* em um clone e duas variedades de cana-de-açúcar e estimar sobre a tolerância/resistência ao patógeno. O experimento foi conduzido em delineamento de blocos casualizados, com quatro repetições, em área da fazenda experimental da UFGD, no período de 2015/2016 em Dourados/MS. Foi realizada a inoculação de uma suspensão de teliósporos de *Sporisorium scitamineum* em 4 genótipos de cana-de-açúcar, com reações diferentes ao carvão. Foram avaliadas as características: número total de touceiras (NTT), número total de perfilhos (NTP), número de plantas doentes (NPD) e número total de chicotes (NTC). Os dados foram analisados em blocos ao acaso com medidas repetidas no tempo. O resultado das quantificações do carvão entre os genótipos da cana-de-açúcar, não foram significativos para os caracteres de número de plantas doentes (NPD) e número total de chicotes (NTC). No entanto, por meio das médias e representações gráficas, foi possível verificar que a incidência do fungo variou entre os genótipos. A variedade A considerada de reação desconhecida ao carvão, apresentou valores médios de incidência de plantas doentes similares ao do clone A e da variedade B, considerados de reação susceptível ao patógeno *Sporisorium scitamineum*. A variedade C não apresentou sintomas da doença mesmo diante da inoculação do patógeno, confirmando a sua reação de resistência.

**Palavras-chave:** *Saccharum officinarum* L.; *Sporisorium scitamineum*; Inoculação.



A pedido da autora o Capítulo 1 foi retirado do pdf.

SILVA, P.C. CAPÍTULO 2: OTIMIZAÇÃO DE PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE DNA DE TECIDO FOLIAR DA CANA-DE-AÇÚCAR, 2016. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biotecnologia) – Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados/ MS.

### RESUMO

Uma das principais doenças da cana-de-açúcar o carvão, é causada pelo fungo *Sporisorium scitamineum*, este com período de incubação longo, dificultando sua detecção precoce, podendo levar a perda de 100% da produtividade em genótipos susceptíveis. As técnicas de biologia molecular permitem a identificação e caracterização de genes de importância econômica, podendo ser empregada, por exemplo, na diagnose precoce de doenças, como do carvão, possibilitando fonte de informações relevantes em programas de melhoramento. Neste aspecto, este trabalho tem como objetivo otimizar um protocolo de extração de DNA do tecido foliar de cana-de-açúcar baseado no método Dodecil Sulfato de Sódio (SDS), que possa ser empregado na diagnose precoce da presença do fungo *Sporisorium scitamineum* por técnicas moleculares. Para a otimização da metodologia da extração de DNA, foram realizadas extrações do DNA de tecido foliar de cana-de-açúcar, em duplicata, de acordo com o protocolo 1 e protocolo 2 com adaptações. O número de amostras extraídas e a qualidade do DNA segundo a metodologia 1, foi menos eficiente extraindo 20% das amostras, com valor médio da quantificação do DNA de 37,12ng/μl, o protocolo 2 com adaptações possibilitou a extração de 66,66% das amostras, com valor médio da quantificação de 147,57ng/μl. Adaptações no protocolo baseado no método Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) de Dellaporta et al. (1983), implicaram em resultados eficientes na extração de DNA do tecido foliar de cana-de-açúcar. Mostrando-se promissor para ser aplicado em estudos futuros de amplificação e caracterização molecular, podendo auxiliar na diagnose precoce de doenças como o carvão e sobre a susceptibilidade e tolerância/resistência das cultivares.

**Palavras-chave:** *Saccharum officinarum*, biotecnologia, DNA gênomico.

## **CAPÍTULO 2. OTIMIZAÇÃO DE PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE DNA DE TECIDO FOLIAR DA CANA-DE-AÇÚCAR**

### **1 - INTRODUÇÃO**

Uma dos patógenos mais importantes da cultura da cana-de-açúcar é *Sporisorium scitamineum*, que causa a doença do carvão. Este patógeno pode acarretar na redução de perfilhos industrializáveis e no teor de sacarose, ocasionando danos em torno de 80% em cultivares susceptíveis.

Os sintomas causados pelo *S. scitamineum*, aparecem em torno 2 à 4 meses de idade, com o pico entre 6 à 7 meses. Constituída por uma estrutura de teliósporos unicelulares e dicarióticos, que é conhecida como chicote, devido a sua forma.

Uma das formas de controle desta doença é por meio do uso de cultivares de cana-de-açúcar resistentes ao patógeno causador do carvão. As cultivares resistentes são normalmente obtidas em Programas de Melhoramento de Plantas, que muitas vezes utilizam as técnicas de biologia molecular, como por exemplo na detecção precoce de doenças.

Para isto, são necessárias amostras de DNA genômico íntegro e em quantidade suficiente para análises, sendo essencial que se disponha de métodos de extração rápidos e eficientes na obtenção de DNA de boa qualidade.

Atualmente, encontram-se na literatura vários os métodos de extração utilizados na obtenção de DNA de cana-de-açúcar, como o de Keb-Llanes et al. (2002), e Doyle & Doyle (1990). Entretanto, problemas com contaminação por compostos fenólicos são comuns e podem dificultar os processos de amplificação do material genético alvo (SAHA et al., 1997).

Diante disso, o objetivo deste trabalho foi de otimizar um protocolo de extração de DNA do tecido foliar de cana-de-açúcar baseado no método Dodecil Sulfato de Sódio (SDS), que possa ser empregado na diagnose precoce do patógeno *Sporisorium scitamineum*.

## 2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 - A biotecnologia e o uso de marcadores moleculares na cana-de-açúcar

A biotecnologia pode ser definida como um conjunto de técnicas de manipulação de sistemas biológicos, organismos ou derivados desses para produzir ou modificar produtos, processos e serviços específicos. Esse conceito amplo inclui metodologias que são utilizadas em grande escala na agricultura desde o início do século XX, como a cultura de tecidos, a fixação biológica de nitrogênio, o controle biológico de pragas, e mais recente o uso de técnicas moleculares (SILVEIRA et al., 2005).

O genoma de cada indivíduo possui sequências específicas de nucleotídeos, que o diferencia dos demais, a análise molecular permite detectar variabilidade, como também determinar pontos de referência nos cromossomos, possibilitando assim, um aumento da eficiência da seleção precoce e/ou indireta em cana-de-açúcar (LANDELL & SILVA, 2004).

O desenvolvimento de marcadores moleculares para a escolha de parentais superiores, ou genes ligados a resistência contra pragas e agentes patogênicos, como no caso do fungo *Sporisorium scitamineum*, permite uma detecção mais rápida e uma condução mais precisa dos programas quando comparado às seleções baseadas em métodos convencionais, pois os marcadores não sofrem influência do ambiente, e possibilitam a triagem de características qualitativas e/ou quantitativas em clones ainda em fase juvenil (*seedlings*), reduzindo assim, o tempo e a área de experimentação necessária (ALZATE-MARIN et al., 2005).

### 2.2 – Extração de DNA

A extração de DNA é o primeiro passo para sua utilização em técnicas moleculares. Neste aspecto, a qualidade e integridade do DNA são fundamentais para o sucesso nas etapas posteriores. Existem diferentes protocolos de extração de DNA, que variam em função da espécie e do tecido a ser utilizado (BERED, 1998; COSTA et al., 2012).

A maioria dos métodos de isolamento de DNA emprega detergentes na elaboração do tampão de lise. Eles auxiliam desde a solubilização das membranas celulares até a desnaturação de proteínas. Os mais utilizados são o Cetyl Trimethyl

Ammonium Bromidecetiltrimetilamônio (CTAB) e o Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) (ROMANO & BRASILEIRO, 1999).

Normalmente, estudos de identificação e de caracterização da diversidade genética das plantas, por meio de técnicas moleculares, envolvem a avaliação de um grande número de indivíduos, necessitando-se de métodos rápidos e precisos de extração de DNA (MAIA et al., 2013).

As folhas de tecido vegetal possuem níveis variados de alcalóides, estereóides, flavonóides, glicosídeos cianogênicos, gomas, taninos, resinas e alguns ácidos. O co-isolamento de polissacarídeos, fenóis e compostos secundários é o principal problema encontrado no isolamento e purificação de DNA vegetal (MERCADO et al., 1999; ROMANO & BRASILEIRO, 1999; KIDWELL & OSBORN, 1992). Podendo danificar o DNA comprometendo a extração e inibir a ação da enzima *Taq* DNA polimerase, utilizada na amplificação de fragmentos de DNA através da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), entre outras técnicas (DUKE, 1989; COUCH & FRITZ, 1990; LODHI et al., 1994).

### 3 - MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi implantado em 24 de fevereiro de 2015 em casa de vegetação na Fazenda Experimental de Ciências Agrárias (FAECA) da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD) no município de Dourados-MS.

Duzentas gemas de 4 genótipos de cana-de-açúcar, sendo 1 clone e 3 variedades, com reações diferentes ao carvão, foram dispostos em copos descartáveis de 500mL contendo substrato. Os substratos foram compostos por areia grossa (30%) e terra de barranco (70%), sendo peneirados e misturados.

As gemas de cana-de-açúcar com 9 meses de idade, foram dispostas em copos descartáveis em casa de vegetação, realizando a inoculação de uma suspensão de teliósporos de *Sporisorium scitamineum*, na concentração de  $9 \times 10^{12}$  esporos mL<sup>-1</sup> (CASAGRANDE, 1998), sendo depositado 1mL da suspensão em cada gema. Os teliósporos foram obtidos da coleta de 3 chicotes de carvão na (FAECA) e levados ao Centro de Biotecnologia e Melhoramento de Cana-de-açúcar da UFGD, onde realizou-se a extração dos teliósporos por meio de raspagem, com o auxílio de uma lâmina de bisturi. A contagem dos teliósporos foi dada em câmara de Neubauer, e posteriormente os teliósporos foram suspensos em água.

No período de março de 2015 aos 30 dias após o plantio das gemas em casa de vegetação, quando as plantas apresentavam folhas medianas para o corte, foram

coletadas 80 folhas das plântulas de cana-de-açúcar. As folhas foram armazenadas em tubos tipo Falcon de 20mL identificados e acondicionadas em gelo para serem transportadas até o Centro de Biotecnologia e melhoramento de Cana-de-açúcar da UFGD, e posteriormente foram armazenadas em freezer -80°C. No período de agosto à outubro de 2015 foram realizadas as extrações do DNA do tecido foliar de cana-de-açúcar, em duplicata, de acordo com o protocolo 1 (Anexo A) e protocolo 2 com adaptações, na extração de ambas metodologias, foram utilizados o tecido das mesmas folhas.

Para o protocolo 1 foram realizadas extrações do DNA de 15 amostras do tecido foliar de cana-de-açúcar. Adicionaram-se as amostras 500µl de tampão Dellaporta (SDS 20% (p/v), NaCl 5M, Tris-HCl 1M pH8,0; EDTA 2Na 0,5M pH8,0, β-mercaptoetanol) e macerou-se o tecido com um pistilo de porcelana autoclavado. Após, o tecido foliar macerado foi transferido para um tubo tipo Eppendorf, onde foi adicionado 33µl de SDS 20% e incubados em banho-maria por 10 minutos a 65°C.

Adicionou-se 160µl de acetato de potássio 5M por tubo e foram agitados em vortex. Seguiu-se com centrifugação a 12.000rpm por 10 minutos, coletando o sobrenadante para um novo tubo estéril. Foi adicionado 300µl de isopropanol 4°C ao sobrenadante e os tubos foram invertidos gentilmente para a precipitação do DNA. Seguiu-se com centrifugação a 12.000rpm por 10 minutos e descartou-se o sobrenadante. Foram adicionados aos tubos 300µl de etanol 75% 4°C e centrifugados a 12.000rpm por 5 minutos, ao final descartou-se o etanol. Os tubos foram levados em estufa a 40°C durante 60 minutos para secagem do precipitado, ressuspensando o pellet em 50µl de água Mili-Q.

Para o protocolo 2 com adaptações, foram realizadas extrações do DNA de 60 amostras de tecido foliar de cana-de-açúcar. A metodologia com adaptações difere-se pela quantidade de tampão utilizado em cada amostra de 500µL para 900µL, no uso do reagente β-mercaptoetanol de 5µL para 10µL, aumento da quantidade do acetato de potássio de 160µL para 400µL, o uso do clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), lavagem extra do pellet com álcool 70%, ressuspensão do pellet em TE, e pelo uso da RNaseA.

Transferiu-se 15mL de tampão (Tris-Hcl 1M pH 8,0; EDTA 0,5M pH 8,0; NaCl 5M; e β-mercaptoetanol) para um tubo tipo Falcon e adicionou-se 1mL de SDS 20%, após homogeneização, levou-se em banho-maria a 65°C. As folhas foram repicadas com auxílio de lâmina de bisturi sob vidro relógio. O tecido foi macerado em almofariz com um pistilo autoclavado, levando em freezer -80°C por 10 minutos, após macerou-se

novamente e foi adicionado 900µl de tampão. O macerado foi transferido para um tubo tipo eppendorf, onde foi adicionando 33µl de SDS 20% e levado ao vortéx, após incubou-se por 10 minutos em banho-maria a 65°C.

Posteriormente, foram adicionados na amostra 400µl de acetato de potássio frio 5M, agitando em vortéx e seguindo com centrifugação a 12.000rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e transferido para um novo tubo, adicionando-se 350µl de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) e centrifugação a 12.000rpm por 10 minutos. Transferindo novamente o sobrenadante para um novo tubo, ao qual adicionaram-se 300µl de isopropanol gelado, os tubos foram invertidos gentilmente e levados para centrifugação a 12.000rpm por 10 minutos, após descartou-se o sobrenadante. Adicionaram-se 300µl de álcool 70% gelado, seguindo com centrifugação a 12.000 rpm por 5 minutos e após o etanol foi descartado, sendo o processo repetido por 2 vezes.

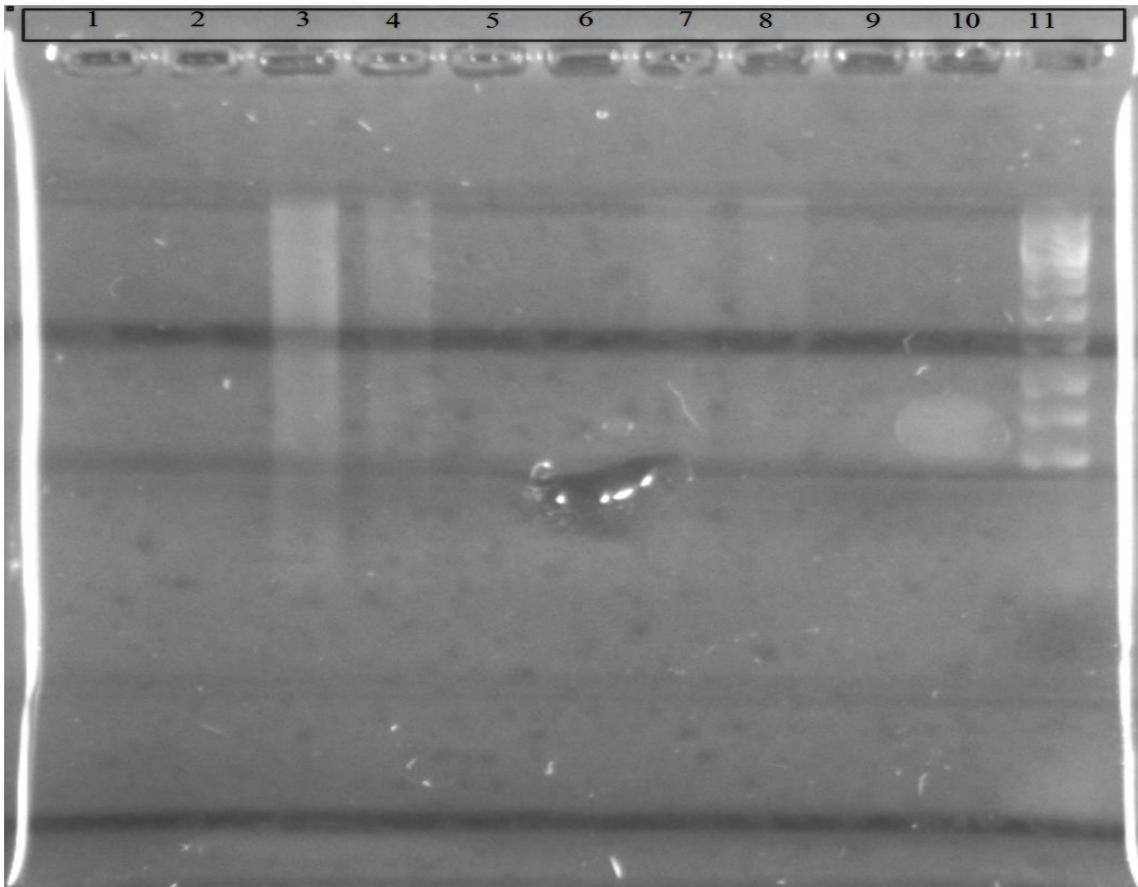
Levou-se em estufa a 40°C durante 60 minutos para secagem do precipitado, ressuspendendo o pellet em 25µl de tampão TE, após adicionou-se 1µl de RNaseA e levou em banho-maria por 20 minutos a 56°C.

Após os procedimentos de extração, utilizou-se 1µL de cada amostra extraída para determinar a pureza do DNA por meio da leitura de absorbância em 260nm (UV – que mede a concentração do DNA em mg/mL) e em 280nm (quantificação de proteínas) em aparelho de espectrofotômetro. A relação 260/280nm foi utilizada como indicativo do grau de pureza do DNA obtido (NOGUEIRA et al. 2004). A quantidade e a qualidade do DNA extraído foi determinada em gel de agarose 1% por eletroforese, corado com Brometo de Etídio ou Gel Red e como carreador foi utilizado 2µL de Azul de Bromofenol. Os géis foram analisados utilizando aparelho transiluminador de 300nm e posteriormente foram fotografados e salvos para análises.

#### 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com o uso do protocolo 1, apenas quatro amostras (13,33%) de 30 foram extraídas. O DNA apresentou quantificações média de 37,12 $\eta$ g/ $\mu$ l, e a razão da absorbância 260/280 < 1,8, indicando contaminação por proteínas. Isto pode ter ocorrido devido a reduzida quantidade de  $\beta$ -mercaptoetanol no tampão de extração. O  $\beta$ -mercaptoetanol atua nas estruturas terciárias das proteínas induzindo a perda de sua conformação espacial e desnaturando-as. Os resultados obtidos neste trabalho, com o protocolo 1, inviabilizaram a utilização da metodologia para a extração de DNA do tecido foliar da cana-de-açúcar.

Segundo Ferreira e Grattapaglia (1998), a integridade do DNA é fundamental para o sucesso nas etapas posteriores, como exemplo na amplificação via PCR (reação em cadeia da polimerase). Embora essa metodologia não tenha mostrado eficiência, ela permitiu a extração de quatro amostras, com quantificações de DNA de aproximadamente 42, 38, 30 e 40  $\eta$ g/ $\mu$ l, colunas 3, 4, 7 e 8, respectivamente. Sugerindo que, adaptações nessa metodologia poderia implicar em melhores resultados (Figura 1).



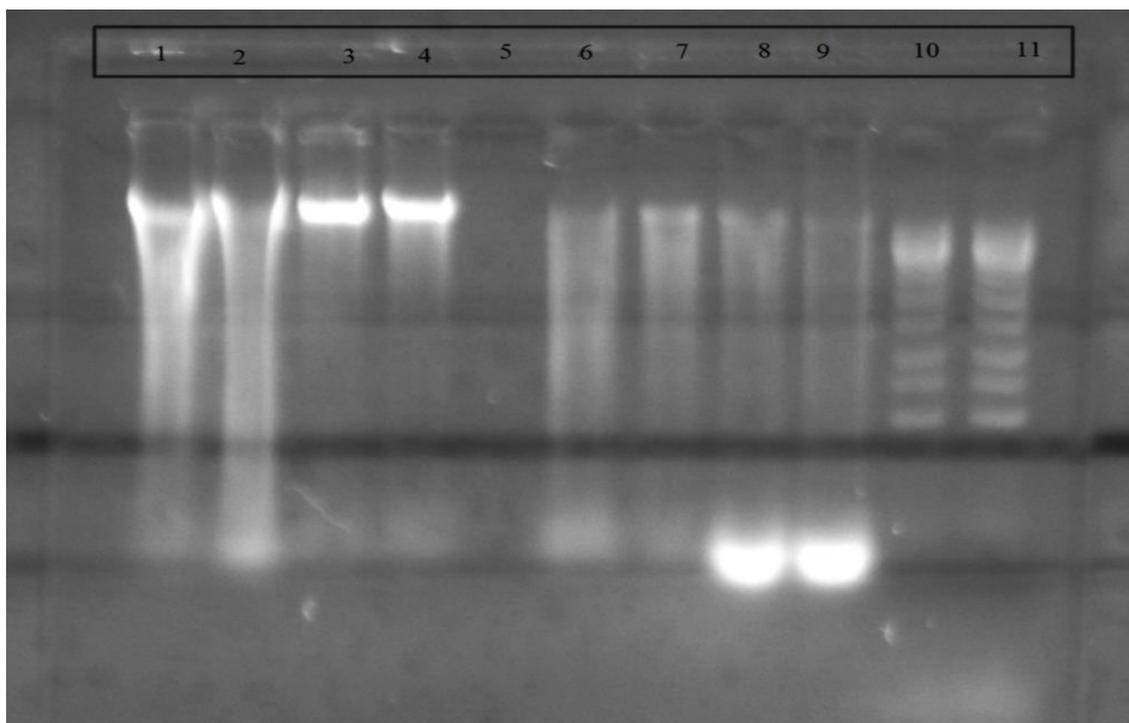
**Figura 1.** Imagem de gel de agarose submetido a eletroforese do DNA genômico de cana-de-açúcar, utilizando o protocolo 1. De 1 a 10 amostras de *Saccharum officinarum*, 11 DNA ladder ruller.

O protocolo 2 com adaptações, possibilitou a extração de 80 (66,66%) das 120 amostras, com bandas de DNA visíveis (Figura 2), sendo os valores médio da quantificação do DNA entre 147,57  $\eta\text{g}/\mu\text{l}$ , e a média das razões das absorbâncias (A260/A280) dos DNAs de 1,85 (Tabela 10), satisfazendo os valores recomendado por Sambrook, et al, (1989) que é de  $\geq 1,8$  indicando um DNA em bom estado. As técnicas de quantificação fornecem informações importantes, visto que um dos objetivos da extração é fornecer DNA de qualidade. Segundo Tiwari et al. (2012) a otimização de protocolos de extração de DNA para serem utilizados em procedimentos de biologia molecular é um passo necessário para a obtenção de resultados.

No procedimento com adaptações, na solução tampão dobrou-se a quantidade de  $\beta$ -mercaptoetanol (5 $\mu\text{l}$  para 10 $\mu\text{l}$ ), este também apresenta efeito antioxidante possibilitando a possível eliminação de polissacarídeos. Na otimização do protocolo Dellaporta et. al. (1983) para *Acmella uliginosa* Sá et al. (2012), procederam aumentando a quantidade do reagente  $\beta$ -mercaptoetanol, relatando eficiência ao passo que foram extraídas amostras com maior quantidade de DNA e de qualidade satisfatória.

Nas amostras do tecido foliar aplicou-se 400 $\mu\text{l}$  a mais da solução (volume final 900 $\mu\text{l}$ ). Nas etapas de lavagem do precipitado foi adicionado o clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) e o uso do álcool 70% por duas vezes. O clorofórmio promove o desnaturamento de lipídios, proteínas e polissacarídeos, e determina maior estabilidade da interface entre o solvente e a fase aquosa. Segundo Bonato et al. (2002), a inclusão da etapa clorofórmio no processo de extração em *Stylosanthes* foi fundamental para a obtenção de DNA de qualidade. O álcool isoamílico previne a formação de espuma quando a mistura é agitada em vórtex, o que torna mais fácil a separação das fases orgânica e aquosa. A proteína desnaturada forma uma camada na interface das duas fases, separando-se do DNA que se mantém na fase aquosa.

A maioria dos solutos inorgânicos e moléculas orgânicas pequenas são solúveis em etanol 70%, a lavagem extra do precipitado promove dessalinização o DNA de forma mais eficiente. E ao final, o uso da solução com RNaseA, teve como função inativar as moléculas de RNA, permanecendo apenas o DNA para ser submetido as análises.



**Figura 2.** Imagem de gel de agarose submetido a eletroforese do DNA genômico de cana-de-açúcar, utilizando o protocolo 2 com adaptações. De 1 ao 4 e 6 ao 9 amostras de *Saccharum officinarum*, 10 e 11 DNA ladder ruler, 100pb.

Na imagem do gel de agarose para o protocolo 2 com adaptações, a quantidade média das amostras de DNA aplicada nos poços foram de aproximadamente 280, 300, 480, 560, 60, 90, 100, 30 e 40  $\eta\text{g}/\mu\text{l}$ , colunas 1 a 4 e 6 a 9, respectivamente. Onde, as amostras acima de 100  $\eta\text{g}/\mu\text{l}$  foram mais visíveis sob o gel de agarose.

Os poços 1, 2, (figura 2) apresentaram um arraste intenso das bandas nos géis, indicando desnaturamento do DNA. Os poços 8 e 9 a amostra apresenta a possível presença de RNA, onde durante o tratamento da amostra a RNase pode não ter sido ativa. As amostras nos poços 3 e 4, apresentaram bandas nítidas, com pouco arraste, apresentando um DNA íntegro.

De acordo com a tabela 1, podemos observar a porcentagem da quantidade de amostras que foram extraídas, onde 13,66% apresentaram valores na quantificação de DNA superiores a 100  $\eta\text{g}/\mu\text{l}$ , e 18,01% das amostras com quantificação acima de 220  $\eta\text{g}/\mu\text{l}$ , sendo que as amostras que apresentaram as melhores visualizações e bandas de DNA mais integras sob o gel de agarose, foram as amostras com quantificação de DNA superiores a 200  $\eta\text{g}/\mu\text{l}$ .

**Tabela 1.** Quantidades em porcentagem de amostras extraídas, referentes as médias das quantificações de DNA ( $\eta\text{g}/\mu\text{l}$ ) genômico de cana-de-açúcar, determinadas através das leituras de absorvância sobre luz UV A260/A280.

	<b>Valores médios das quantificações de DNA (<math>\mu\text{l}</math>)</b>						
	20-60	60-100	100-140	140-180	180-220	220-600	600 $\geq$
Quantidade de amostras (%)	28,05	19,42	13,66	17,26	3,60	11,51	6,50

\* Análise em colunas.

## 5 - CONCLUSÃO

As adaptações no protocolo baseado no método Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) implicaram em resultados eficientes na extração de DNA do tecido foliar de cana-de-açúcar; mostrando-se promissor para ser aplicado em estudos futuros de amplificação e caracterização molecular, podendo auxiliar na diagnose precoce de doenças como o carvão e estimar sobre a susceptibilidade e tolerância/resistência das cultivares.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXANDER, A.G. **Sugarcane physiology**: A comprehensive study of the *Saccharum* source-to-sink system. 11. Ed. Amsterdam: Elsevier Scientific, 1973. 725 p.

ALEXANDER, K.C.; RAMAKRISHNAN, K. Studies on the smut disease (*Sporisorium scitamineum* Sydow) of sugarcane: 4 – parasitism – germination – dikaryotisation and infection. **Proceedings Internacional Society Sugar Cane Technology**, São Paulo, v. 16, p.469-472, 1977.

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**, Brasília, v.30, n.4, p.333-42, 2005.

ANDRADE, J.A.C., MIRANDA J.B. F. Quantitative variation in the tropical maize population, ESALQ-PB1. **Scientia Agricola**. Piracicaba, v. 65, n. 2, Abril, 2008.

AUDE, M.I.S. Estádios de desenvolvimento da cana-de-açúcar e suas relações com a produtividade. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 23, n. 2, p. 241-248, 1993.

BENDA, G.T.A. **Breeding for disease resistance**. In: COPERSUCAR INTERNATIONAL SUGARCANE BREEDING WORKSHOP. Piracicaba.: Copersucar. 1987. p. 161-179.

BERED, F. **Extração de DNA - considerações e prática**. In: MILACH, S.C.K., ed. Marcadores moleculares em plantas. Porto Alegre: UFAS, 1998. p.91-97.

BERGAMIN, F. A.; AMORIM, L.; CARDOSO, C.O.N.; SANGUINO, A.; IRVINE, J.E., SILVA, W.M. Carvão da cana-de-açúcar e sua epidemiologia. **Boletim Técnico Copersucar** (Ed. Especial), Piracicaba, p.1-23, 1987.

BIANCHINI, A.; MARINGONI, A. C. e CARNEIRO, S.M.T.P.G.; Doenças da Cana (*Shaccharum* spp.). KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; **Manual de fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas**. 4ª Ed. Vol. 2, pag. 459-460 – São Paulo: Agronômica Ceres, 2005

BIOSUL - Associação dos Produtores de Bioenergia de Mato Grosso do Sul. **ACOMPANHAMENTO DA SAFRA 2015/2016 PRODUÇÃO ATÉ 29/FEVEREIRO**. Disponível em: <[http://www.biosulms.com.br/\\_arquivos/resultado/88574098956e175f057e507.01035444.pdf](http://www.biosulms.com.br/_arquivos/resultado/88574098956e175f057e507.01035444.pdf)> Acesso em: 03, abril, 2016.

BONATO, A. L. V.; VERZIGNASSI, J. R.; RESENDE, R. M. S.; FERNANDES, C. D.; LEGUIZAMON, G. O. de C. **Extração de DNA genômico de *Stylosanthes* spp.** Campo Grande, MS: Embrapa Gado de Corte, 2002. 4 p. (Embrapa Gado de Corte. Comunicado Técnico, 78).

BORÉM, A. **Melhoramento de plantas**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2001. 300p.

CÂMARA, G.M.S. Ecofisiologia da cultura da cana-de-açúcar. In: CÂMARA, G.M.S.; OLIVEIRA, E.A.M. **Produção de cana-de-açúcar**. Piracicaba: FEALQ, 1993. cap. 3, p. 31-64.

CAMARGO, P.N. **Fisiologia de la caña de azucar**. Trad. de B. Ortiz-villanueva. México: Instituto para el Mejoramiento de la Producción de Azúcar, 1976. 63 p.

CASAGRANDE, A.A. **Tópicos de morfologia e fisiologia da cana-de-açúcar**. Jaboticabal: FUNEP, 1991. 157 p.

CASAGRANDE, M.V. **Avaliação da incidência da doença e estimativa de danos ocasionados pelo carvão (*Sporisorium scitamineum* Sydow) em variedades de cana-de-açúcar**. 1998. 86 p. Tese (Mestrado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1998.

CASTRO, P.R.C.; KLUGE, R.A.(Ed.). **Ecofisiologia de culturas extrativas: cana-de-açúcar; seringueira; coqueiro; dendezeiro e oliveira**. Cosmópolis: Editora Stoller do Brasil, 2001. 138 p.

CHEN, J.C.P.; CHOU, C. Cane Sugar Handbook. **A manual for cane sugar manufacturers and their chemists**. 12 nd.ed. New York John Wiley & Sons, 1993.

COIMBRA, R.R., MIRANDA, G.V., VIANA, J.M.S., CRUZ, C.D., MURAKAMI, D.M., SOUZA, L.V., FIDELIS, R.R.. Estimation of genetic parameters and prediction of gains for DFT1-Ribeirão popcorn population. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Viçosa, v. 2, n. 1, p. 33-38, 2002.

COMSTOCK, J.C.; FERREIRA, S.A; TEW, T.L. Hawaii’s approach to control of sugarcane smut. **Plant Disease**, St. Paul, v.67, p.452-457, 1983.

COMSTOCK, J.C.; LENTINI, R.S. Sugarcane smut disease. **Florida sugarcane disease**, Florida, 2005. Disponível em: <http://edis.ifas.ufl.edu/sc008> . Acesso: 30, outubro, 2015.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar, V. 2 – Safra 2015/16 N. 2 – Segundo levantamento Agosto/2015**.<[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/15\\_09\\_11\\_10\\_51\\_14\\_boletim\\_cana\\_portugues\\_-\\_2o\\_lev\\_-\\_15-16.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/15_09_11_10_51_14_boletim_cana_portugues_-_2o_lev_-_15-16.pdf) >. Acesso em: 08, novembro, 2015.

COPERSUCAR. COOPERATIVA CENTRAL DOS PRODUTORES DE CANA, AÇÚCAR E ÁLCOOL DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Avaliação de diferentes métodos de inoculação do carvão da cana-de-açúcar (*Sporisorium scitamineum* Sydow)**. Piracicaba: Centro de Tecnologia Copersucar, 1995. 19p. (Relatório Anual 1994/95).

COSTA, M. R. T. R.; BONFIM, K.; NASCIMENTO, S.V . **Encontro Amazônico de Agrárias**. Ano: 04, Nº 02, Março de 2012 – ISBN: 978-85-7295-078-7.

COUCH, J.A.; FRITZ, P.J. Isolation of DNA from plants high in polyphenolics. **Plant Molecular Biology Reporter**, Tucson, v.8, p.8-12, 1990.

CRUZ, C. D.; CARNEIRO, P. C. S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa: UFV, 2003. , 585 p. v. 2.

DANIELS, J., ROACH, B.T. Taxonomy and evolution. p.7-84. *In* Heinz, D.J. (ed.) **Sugarcane improvement through breeding**. Elsevier, Amsterdam, 1987.

DEAN, J.L. The effect of wounding and high pressure spray inoculation on the reactions of sugarcane clones. **Phytopathology**, Lancaster, v. 72, p. 1023-1025, 1982.

DELGADO, A. A.; AZEREDO C. M. A. **Elementos de tecnologia e engenharia do açúcar de cana**. Vol. II. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1977.

DELLAPORTA, S. L.; WOOD, J.; HICKS, J. B. A plant minipreparation: version II. **Plant Molecular Biology Report**, Issue, v. 1, n. 4, p. 19-20, Sept. 1983.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, Rockville, v. 12, n. 1, p. 13-15, 1990.

DILLEWIJN, C. V. Botany of sugarcane. In: Waltham, Mass. **The Chronica Botanica**. New York: Stechert-Hafner, v.116, p.333, 1952.

DUARTE, M.; TOKESHI, H. Inoculation of sugarcane seedlings for selection of resistance to *Sporisorium scitamineum*. **Proceedings Internacional Society Sugar Cane Technology**, London, v.16, p.383-393, 1978.

DUKE, J. A. **Handbook of Medicinal Herbs**. Florida: CRC Press, 1989. 667p.

EMBRAPA. Estação climatológica Embrapa Agropecuária Oeste (CPAO) de Dourados. **Guia e Clima**, 2016. Disponível em: <<http://www.cpaio.embrapa.br/clima/?lc=site/estatisticas/estatisticas-ver-dados>>. Acesso em: 13, fevereiro, 2016.

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

FERREIRA; S.A., COMSTOCK, J.C. Smut. In: RICAUD, C.; EGAN, B.T.; GILLASPIE JR.; A.G.; HUGHES, C.G. (Ed.). **Diseases of Sugarcane – Major Diseases**. Amsterdam: Elsevier, 1989. p.211-229.

FREITAS, E. G. **Análise de dados longitudinais em experimentos com cana-de-açúcar**. 2007. 70 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2007.

GRAVINA, G. A., FILHO, S.M., SEDIYAMA, C. S., CRUZ, C. D. Joint scaling test to estimate genetic parameters of soybean resistance to frogeye leaf spot. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Viçosa, v. 3, n. 1, p. 53-60, 2003.

GRIVET L; ARRUDA P. Sugarcane genomics: depicting the complex genome of an important tropical crop. **Current Opinion in Plant Biology** 5: 122-127, 2001.

HALLAUER, A. R.; MIRANDA FILHO, J. B. **Quantitative genetics in maize breeding**. Ames: Iowa State University Press, 1988. 468 p.

Hawksworth, D. L., P. M. Kirk, B. C. Sutton, and D. N. Pegler. Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi (8th Ed.). **CAB International, Wallingford**, United Kingdom, 1995. 616p.

HIRSCHHORN, E. **Caracteres del ciclo evolutivo del carbon de la caña de azucar**. Ministerio de Agricultura Y Ganaderia, Buenos Aires, n.3, p.317-324, 1950. (Publicação Técnica)

HOAGLIN, D.C. et al. **Understanding robust and exploratory data analysis**. New York: John Wiley & Sons, 1983. 447 p.

IDEA ONLINE. **Carvão reduz TCH da cana-de-açúcar em 0,89% a cada 1% de touceiras infectadas**. Grupo Idea, 2015 . Disponível em: <<http://www.ideaonline.com.br/clipping/carvao-reduz-tch-da-cana-de-acucar-em089-a-cada1-de-touceiras-infectadas.html>>. Acesso em: 13, novembro, 2015.

keb Ilanes M, Gonzalez G, Chi-manzanero B, Infante D. A rapid and simple method for small scale DNA extraction in Agavaceae and other tropical plants. **Plant Molecular Biology Reporter**. Canada, Vol. 20: 299a-299e, september 2002.

KIDWELL, K.K.; OSBORN, T.C. **Simple plant DNA isolation procedures**. In: BECKMANN, J.S.; OSBORN, T.C. *Plant genomes: methods for genetic and physical mapping*. London: Kluwer Academic Publ., 1992. p.1-13.

LANDELL, M. G. A.; PINTO, L. R.; CRESTE, S.; XAVIER, M. A.; ANJOS, I. A.; VASCONCELOS, A. C. M.; BIDÓIA, M. A. P.; SILVA, D. N.; SILVA, M. A. Seleção de novas variedades de cana-de-açúcar e seu manejo de produção. **Encarte de informações agronômicas**, n. 110, p. 18-24, jun. 2005.

LANDELL, M. G. A.; SILVA, M. A. As estratégias de seleção da cana em desenvolvimento no Brasil. **Visão Agrícola**, Pontal, v1, n.1, p. 19-20, 2004.

LEE-LOVICK, G., MOSTELLER, F., TUKEY, J. W. Smut of sugarcane-*Sporisorium scitamineum*. Rev. **Plant Pathology**. 147: p.181-188, 1978.

LEU, L.S.; WISMER, C.A.; DANIELS, J.; HUTCHINSON, P.B. Cooperative programs for screening sugarcane varieties for resistance to diseases (1) Taiwan Program. **Sugar Pathologists Newsletter**, Louisiana, v.4, p.36-37, 1970.

LODHI, M.A.; YE, G.N.; WEEDEN, N.F.; REISCH, B.I. A simple and eficiente method for DNA extraction from grapevine cultivars and -Vitis species. **Plant Molecular Biology Reporter**, Chicago, v.12, p.6-13, 1994.

MAIA, M.S., BRUMER, B.B., NOVAES, R.M.L., SILVA, D.C.G., KUWAHARA, M.K., DALCIN, M.B., MARCELINO-GUIMARAES, F.C., ABDELNOOR, R.V. Método de extração de DNA de folhas de soja adaptado para larga escala. In: VIII Jornada Acadêmica da Embrapa Soja, 9., 2013. Londrina. **Resumos expandidos**. Londrina: VIII Jornada Acadêmica da Embrapa Soja, 2013. p.44-49.

MALAVOLTA, E., HAAG, H. P. Fisiologia. In: MALAVOLTA, E., SEGALA, A.L, GOMES, F.P. **Cultivo e adubação da cana-de-açúcar**. Campinas: Instituto Brasileiro de Potassa, 1964. cap. 8, p. 221-236.

MATSUOKA, S.; GARCIA, A. A. F.; ARIZONO, H. **Melhoramento da Cana-de-açúcar**. In: A Borém. (Org.). Melhoramento de Espécies Cultivadas. Viçosa: Editora da Universidade Federal de Viçosa, 1999a, v. 1, p. 205-252.

MATSUOKA, S.; GARCIA, A. A. F.; CALHEIROS, G.C. **Hibridação em Cana-de-açúcar**. In: A Borém. (Org.). Hibridação Artificial de Plantas. Viçosa: Editora da Universidade Federal de Viçosa, 1999b, v. II, p. 221-256.

MATSUOKA, S., GARCIA, A.A.F., ARIZONO, H. **Melhoramento da cana-de-açúcar**. In: Borém, A. (Ed.). Melhoramento de espécies cultivadas. Viçosa: Editora da Universidade Federal de Viçosa, 2005, p. 225-274.

MATSUOKA, S.; SORDI, R.A.; MASUDA, Y.; ARIZONO, H. Realiability and feasibility of the needle-bud puncture method for rapid identification of smut susceptible sugarcane clones. **Proceedings International Society Sugar Cane Technology**, Guatemala, v.19, p.375-385, p.1986.

MELO, L.J.O.T. Desempenho agroindustrial de cultivares de canade-açúcar na zona da mata litoral sul de Pernambuco. **Ciência agrotecnica**. Lavras, v. 33, n. 3, Junho, 2009.

MELO, L.J.O.T. **Interação genótipo x ciclos de colheita de cana-de-açúcar da Zona da Mata Norte de Pernambuco**. *Bragantia*, Campinas, v. 65, n. 2, 2006.

MERCADO, J.A.; MANSOURI, I; JIMÉNEZ-BERMUDEZ, S.; PLIEGO-ALFARO, F.; QUESADA, M.A. A convenient protocol for extraction and purification of DNA from *Fragaria*. **In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant**, v.35, n.2, p.152-153, 1999.

MIOCQUE, J.Y.J.; MACHADO JR., G.R. Review of sugarcane varieties and breeding in Brazil. **Sugarcane Journal**, Jaboticabal, v. 23, p.9-13, 1977.

MIRANDA, A. C.; MORAES, M. L. T.; TAMBARUSSI, E. V.; FURTADO, E. L.; MORI, E. S.; SILVA, P. H. M.; SEBBENN, A. M. Heritability for resistance to *Puccinia psidii* Winter rust in *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden in Southwestern Brazil. **Tree Genetics & Genomes**, Berlin, v. 9, n. 2, p. 321-329, 2013.

MORAIS, O.P., SILVA, J.C., CRUZ, C.D., REGAZZI, A.J., NEVES, P.C.F. Estimação dos parâmetros genéticos da população de arroz irrigado CNA-IRAT 4/0/3. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v.,32, n° ,4, 1997.

Mozambani, A. E.; Pinto, A. S.; Segato, S. V.; Mattiuz, C. F.M. História e morfologia da cana-de-açúcar. In: SEGATO, S.V. et al. Atualização em produção de cana-de-açúcar. **Cadernos Planalsucar**. Piracicaba: 2006.p.11-18.

NOBRE, J. S.; SINGER, J. M. Residuals analysis for linear mixed models. **Biometrical Journal**, Berlin, v. 49, n. 6, p. 863-875, 2007.

NOGUEIRA, C. A. M.; MOMESSO, C. A. S.; MACHADO, R. L. D.; ALMEIDA, M. T. G.; ROSSIT, A. R. B. Desempenho de kits comerciais e protocolos laboratoriais para a extração de DNA genômico bacteriano. **Revista Panamericana de Infectologia**. v. 6, n. 2, p. 35-38, 2004.

PEROS, J.P.; BAUDIN, P. Etude de la variabilité d' *Ustilago scitaminea* Syd., agent du carbón de la canne à sucre. **L'Agronomie Tropicale**, Montpellier, v. 38, p.234-240, 1983.

PIMENTEL GOMES, F. **Curso de estatística experimental**. 14. ed. Piracicaba: Nobel, 2000. 477 p.

RAGO, A.M.; CASAGRANDE, M.V.; MASSOLA JR., N.S. Variabilidade patogênica de *Sporisorium scitamineum* no Estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.35, n.2, p.93-97, 2009.

RAMALHO, M.A.P., SANTOS, J.B., ZIMMERMANN, M.J.O. **Genética quantitativa em plantas autógamas**. Goiânia, 1993. Ed: UFG. 271p.

REDE INTERUNIVERSITÁRIA PARA O DESENVOLVIMENTO DO SETOR SUCROALCOOLEIRO – (RIDESA). **Melhoramento Genético**, 2008. Disponível em: <<http://www.ridesa.agro.ufg.br/p/3721-melhoramento-genetico>>. Acesso em: 10, abril, 2016.

RESENDE, M.D.V. **Genética, biométrica e estatística: no melhoramento de plantas perenes**. Brasília, Embrapa Informação Tecnológica, 975p, 2002<sup>a</sup>.

RIPOLI, T.C.C.; RIPOLI, M.L.C.; CASAGRANDE, D.V.; IDE, B.Y. **Plantio de cana-de-açúcar: Estado da arte**. Piracicaba, p.216, 2006.

ROMANO, E.; BRASILEIRO, A.C.M. Extração de DNA de plantas: Soluções para problemas comumente encontrados. **Biotecnologia Ciência e desenvolvimento**, Brasília, n. 9, p. 40-43, 1999.

ROSSETTO, R. **Agência de Informação Embrapa – cana-de-açúcar**. 2011. Disponível em:<[http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/canadeaucar/arvore/CONTAG01\\_70\\_711200516719.html](http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/canadeaucar/arvore/CONTAG01_70_711200516719.html)> Acesso em: 08, novembro, 2015.

SA, G. H. ; COSTA, M. F. ; GOMES, M. F. C. ; BRITO, M. V. ; SOUSA, C. C. ; GOMES, S. O. ; VIANA, J. P. G. ; LIMA, P. S. C. ; VALENTE, S. E. S. . Análise de

quatro protocolos de extração de DNA em *Acmella uliginosa*. In: II Congresso Brasileiro de Recursos Genéticos, 2012, Belém - PA. **Trabalho completo**. Anais do II Congresso Brasileiro de Recursos Genéticos, 2012.

SAHA, S.; CALLAHAN, F.E.; CREECH, J.B. Cotton improvement effect of lyophilization of cotton tissue on quality of extractable DNA, RNA and protein. **The Journal of Cotton Science**, v.1, p. 10-14, 1997

SANGUINO, A.; TOKESHI, H. Vácuo e *Sporisorium scitamineum* alterando a brotação de cana-de-açúcar. **Brasil Açucareiro**, Araras, v. 6, p. 30-35, 1976.

SAS – Stastitcal Analysis System. Free statistical software. **SAS University Edition**. Versão Online, 2016. Disponível em: <[http://www.sas.com/en\\_us/software/university-edition.html](http://www.sas.com/en_us/software/university-edition.html)> Acesso em: 15, março, 2016.

SEGATO, S.V.; MATTIUZ, C.F.M.; MOZAMBANI, A.E. Aspectos fenológicos da cana-de-açúcar. In: SEGATO, S.V.; PINTO, A.S.; JENDIROBA, E.; NÓBREGA, J.C.M. (Org.). **Atualização em produção de cana-de-açúcar**. Piracicaba: Ed. dos Autores, 2006. cap. 2, p. 19-36.

SIGMA PLOT. Scientific Graphing Software. Versão 10.0. San Rafael, **Jandel Corporation**, 2006.

SILVA, G. C.; DE OLIVEIRA, F. J.; DE MELO, L. J. O. T.; SIMÕES NETO, D. E. **Estimativas de correlações e parâmetros genéticos em clones de cana-de-açúcar no litoral norte da zona da mata em Pernambuco**. In: Congresso Nacional da STAB, 2008, Maceió. Anais... Maceió – STAB, p.487-491, 2008.

SILVA, W.M. **Pré-seleção de “seedling” de cana-de-açúcar resistentes a *Sporisorium scitamineum*, pela inoculação de sementes**. 1978. 65p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1978.

SILVEIRA, J.M.F.J.; BORGES, I.C.; BUAINAIN, A.M. **Biotecnologia e agricultura: da ciência e tecnologia aos impactos da inovação**. São Paulo Perspec., Jun 2005, vol.19, no.2, p.101-114.

SKINNER, J.C., HOGARTH, D.M., WU, K.K. **Selection methods, criteria, and indices**. In: HEINZ, D.J. (ed.). Sugarcane improvement through breeding. Amsterdam: Elsevier, 1987.p. 409-453.

SOUZA, A. P.; GARCIA, A. A. F.; OLIVEIRA, K. M. **Melhoramento genético e mapeamento da cana-de-açúcar**. 2010. Disponível em: <[WWW.APTA.SP.GOV.BR/CANA](http://WWW.APTA.SP.GOV.BR/CANA)>. Acesso em: 08, novembro, 2015.

SRINIVASAN, K.V. Methods for testing the resistance of sugarcane to disease sugarcane smut. **Sugarcane Pathologists Newsletter**, Louisina, v.1, n.2, p.7, 1969.

TIWARI K. S, JADHAV, S.K., GUPTA, S. Modified CTAB Technique for Isolation of DNA from some Medicinal Plants. **Journal of Medicinal Plant**, Raipur, v.6, p.65. 2012.

TOFFANO, W.B. Influência de inoculações sucessivas de *Sporisorium scitamineum* Syd. Em cana-de-açúcar pelo método de vácuo sobre a germinação e a patogenicidade dos esporos. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 44, p.27-31, 1977.

TOKESHI, H. Cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) Controle de Doenças. In: Francisco Xavier Ribeiro do Vale, Laércio Zambolim, M. (Org.). **Controle de Doenças de Plantas: grandes culturas**. Viçosa: UFV, Departamento de Fitopatologia; Brasília, DF: Ministério da Agricultura e do Abastecimento, 1997. v. 2, p. 657-764.

TOKESHI, H. Carvão da cana-de-açúcar: etiologia e medidas de controle. **Revista da Sociedade dos Técnicos Açucareiros e Alcooleiros do Brasil**, Piracicaba: STAB, v. 4, p. 26-34, 1985.

TOKESHI, H.; RAGO, A.M. Doenças da cana-de-açúcar. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. (Ed.). **Manual de Fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas**. São Paulo: Ceres, 2005. v. 2, cap.21,p.185-196.

UNICA - UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR. **Fotografia do setor sucroenergético no brasil**. Única, 2015. Disponível em: <file:///C:/Users/Usuario/Downloads/2f253574533bf5841df311d0e1f2e58e.pdf>. Acesso em: 11, novembro, 2015.

VENCOVSKY, R.; BARRIGA, P. **Genética biométrica no fitomelhoramento**. Ribeirão Preto: Revista Brasileira de Genética, 1992. 496p.

VIANA, A. P. *et al.* Parâmetros genéticos em populações de maracujazeiro amarelo. **Revista Ceres**, v. 51, n. 297, p. 541-555, 2004.

WALKER, D.I.T. Breeding for disease resistance. In: HEINZ, D.J. (Ed.). **Sugarcane improvement through breeding**. Amsterdam: Elsevier. 1987. Chap. 12 p. 455-502.

WALLER, J.M. Sugarcane smut (*Sporisorium scitamineum*) in Kenia I. Epidemiology. **Transactions British Mycological Society**, London, 1969. v.52, p.139-151.

WALLER, J.M. Sugarcane smut (*Sporisorium scitamineum*) in Kenia II. Infection and resistance. **Transactions British Mycological Society**, London, v.54, p. 405-414, 1970.

WHITENEAAD, C. Variety studies. **Reports Experimental Station African Sugar Association**. 1967. p.24-30.

VIANA, A.P.; PEREIRA, T.N.S.; PEREIRA, M.G.; AMARAL JÚNIOR, A.T. do; SOUZA, M.M. de; MALDONADO, J.F.M. Parâmetros genéticos em populações de maracujazeiro-amarelo. **Revista Ceres**, v.51, p.541-551, 2004.

ZAR, J.H. Biostatistical analysis. **Prentice Hall Inc**. New Jersey, 1999. v.4, p.938.

## ANEXO A

### PROTOCOLO 1 - EXTRAÇÃO DELLAPORTA et al. (1983)

TAMPÃO: Solução para 50mL

- 25mL de Tris-Hcl, 1M pH 8,0.
- 25mL de EDTA, 0,5M pH 8,0.
- 7,30 gramas de Nacl 5M..
- 1mL de SDS para 15 mL de tampão (1:15).
- 5 $\mu$ L de  $\beta$ -mercaptoetanol.
- 500 $\mu$ L de tampão por amostra.

1- Adicionou-se as amostras do tecido foliar 500 $\mu$ l de tampão. As amostras foram maceradas com pistilo de porcelana autoclavado. Após esse procedimento foram adicionados aos tubos 33 $\mu$ l de SDS 20% e incubados por 10 minutos a 65°C.

2 – Adicionou-se 160 $\mu$ l de acetato de potássio 5M por tubo, posteriormente agitando em vortex. Seguiu-se com uma centrifugação a 12.000rpm por 10 minutos e coletou-se o sobrenadante para um novo tubo estéril.

3 - Ao sobrenadante foi adicionado 300 $\mu$ l de isopropanol a 4°C e os tubos foram invertidos gentilmente para a precipitação do DNA.

4 – Seguiu-se com uma centrifugação a 12.000rpm por 10 minutos e descartou-se o sobrenadante.

5 - Foram adicionados aos tubos 300 $\mu$ l de etanol 75% a 4°C e centrifugados a 12.000rpm por 5 minutos e descartou o etanol.

6 - Levou-se em estufa a 40°C durante 60 minutos para secagem do precipitado, ressuspendendo o pellet em 50 $\mu$ L de água Milli-Q.

## ANEXO B

### PROTOCOLO 2 COM ADAPTAÇÕES - EXTRAÇÃO DELLAPORTA et al. (1983) COM ADAPTAÇÕES

TAMPÃO: Solução para 50mL

- 25mL de Tris-Hcl, 1M pH 8,0.
- 25mL de EDTA, 0,5M pH 8,0.
- 7,30 gramas de Nacl 5M.
- 10µL de B-mercaptoetanol.
- 1mL de SDS para 15mL de tampão (1:15).
- 900uL de tampão por amostra.

### METODOLOGIA

Transferiu-se 15mL de tampão para um tubo tipo Falcon e adicionou-se 1mL de SDS 20%, misturou-os e levou em banho-maria a 65°C.

1- As folhas foram repicadas com auxílio de lâmina de bisturi sob vidro relógio. O tecido foi macerado em almofariz com um pistilo autoclavado, levando em freezer -80°C por 10 minutos, macerou-se novamente e adicionou-se 900µL de tampão. Transferiu-se o macerado para um tubo tipo Eppendorf.

2- Adicionou-se 33µL de SDS 20% ao tubo, agitando-os em vortéx e incubou-os por 10 minutos em banho-maria a 65°C.

3 – Após, adicionou-se 400µL de acetato de potássio frio 5M, agitando em vortéx, seguindo com centrifugação a 12.000rpm por 10 minutos.

4 – O sobrenadante foi coletado e transferido para um tubo novo, adicionando-se 350µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) e centrifugação a 12.000 rpm por 10 minutos.

5- O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, adicionou-se 300µL de isopropanol gelado, os tubos foram invertidos gentilmente e levados para centrifugação a 12.000 rpm por 10 minutos, após descartou-se o sobrenadante.

6 – Foi adicionado 300µL de álcool 70% gelado ao tubo, seguindo com centrifugação a 12.000rpm por 5 minutos e após o etanol foi descartado, realizando duas vezes este processo.

7 – Levou-se em estufa a 40°C durante 60 minutos para secagem do precipitado, ressuspendendo o pellet em 25µL de tampão TE, após adicionou-se 1µL de RNaseA e levou em banho-maria por 20 minutos a 56°C.

## ANEXO C

### TAMPÃO TE

Reação para 16 mL:

15mL de EDTA 0,5M, pH 8,0.

1mL de Tris-Hcl 1M, pH 8,0.