

**Marcadores ISSR são eficazes para acessar a diversidade genética em germoplasma de trigo (*Triticum aestivum*)**

**ISSR markers are effective to access genetic diversity in germplasm of wheat (*Triticum aestivum*)**

**Los marcadores ISSR son eficaces para evaluar la diversidad genética en el germoplasma de trigo (*Triticum aestivum*)**

Recebido: 27/11/2020 | Revisado: 05/12/2020 | Aceito: 09/12/2020 | Publicado: 13/12/2020

**Polyana Barros Polido**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4095-0372>

Universidade Paranaense, Brasil

E-mail: [polypolido@gmail.com](mailto:polypolido@gmail.com)

**Cristine Bonacina**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4359-5617>

Universidade Paranaense, Brasil

E-mail: [cristinebonacina@hotmail.com](mailto:cristinebonacina@hotmail.com)

**Tania Mayumi Ito**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4937-1753>

Universidade Paranaense, Brasil

E-mail: [saradesf@hotmail.com](mailto:saradesf@hotmail.com)

**Deoclécio Domingos Garbúglio**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7497-3679>

Instituto de Desenvolvimento Rural do Paraná, Brasil

E-mail: [ddgarbuglio@idr.pr.gov.br](mailto:ddgarbuglio@idr.pr.gov.br)

**Silvia Graciele Hülse de Souza**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1994-6229>

Universidade Paranaense, Brasil

E-mail: [silviahulse@prof.unipar.br](mailto:silviahulse@prof.unipar.br)

## **Resumo**

Conhecer a variabilidade genética existente entre cultivares de trigo (*Triticum aestivum*) é de grande importância para os programas de melhoramento. Desta forma, esse trabalho teve como objetivo utilizar marcadores ISSR para acessar a diversidade genética entre acessos

contrastantes de trigo. Para isso, foram avaliados 32 acessos de trigo e um acesso de triticale provenientes do Banco Ativo de Germoplasma de Trigo do Instituto de Desenvolvimento Rural do Paraná (IDR-Paraná). A partir de 10 *primers* de ISSR foram amplificados um total de 66 loci polimórficos com variação média de loci por *primer* de 6,6. A similaridade genética variou de 0,29 a 0,93, com média de 0,57. O dendrograma resultante mostrou 4 grupos, no qual observou-se que os genótipos LD 111202 e LD 111203 apresentaram alto índice de similaridade genética entre si. A análise bayesiana de agrupamento formou quatro grupos, parcialmente concordantes com o agrupamento hierárquico de UPGMA. Os marcadores ISSR foram capazes de discriminar acessos morfológicamente distintos e similares, além de fornecer informações consistentes sobre a variabilidade genética existente entre os genótipos de trigo que auxiliará nos programas de melhoramento genético.

**Palavras-chave:** Estrutura genética; Recursos genéticos; Marcadores moleculares.

### Abstract

Know the genetic variability between wheat cultivars (*Triticum aestivum*) is of great importance for breeding programs. Thus, this work aimed to use ISSR markers to access genetic diversity between contrasting wheat accessions. For this, 32 accessions of wheat and one access of triticale from the Active Bank of Wheat Germplasm of the Institute of Rural Development of Paraná (IDR-Paraná) were evaluated. A total of 66 polymorphic loci were amplified from 10 ISSR primers with an average loci variation per primer of 6.6. Genetic similarity ranged from 0.29 to 0.93, with an average of 0.57. The resulting dendrogram from the data was divided into four groups, in which it was observed that the genotypes LD 111202 and LD 111203 showed a high level of genetic similarity among themselves. The Bayesian cluster analysis formed four groups, partially in agreement with the UPGMA hierarchical cluster. ISSR markers were able to discriminate morphologically distinct and similar accessions and provide consistent information on the genetic variability between wheat genotypes that will help in breeding programs.

**Keywords:** Genetic structure; Genetic resources; Molecular markers.

### Resumen

Conocer la variabilidad genética entre cultivares de trigo (*Triticum aestivum*) es de gran importancia para los programas de mejoramiento. Por lo tanto, este trabajo tuvo como objetivo utilizar marcadores ISSR para acceder a la diversidad genética entre accesiones de

trigo contrastantes. Para eso, se evaluaron 32 accesiones de trigo y un acceso de triticale del Banco Activo de Germoplasma de Trigo del Instituto de Desarrollo Rural de Paraná (IDR-Paraná). Se amplificó un total de 66 loci polimórficos a partir de 10 cebadores ISSR con una variación promedio de 6,6 loci por cebador. La similitud genética osciló entre 0,29 y 0,93, con un promedio de 0,57. El dendrograma resultante de los datos se dividió en 4 grupos, en los que se observó que los genotipos LD 111202 y LD 111203 mostraron una alta tasa de similitud genética entre sí. El análisis de conglomerados bayesianos formó cuatro grupos, parcialmente de acuerdo con el conglomerado jerárquico de UPGMA. Los marcadores ISSR pudieron discriminar accesiones distintas y similares, además de proporcionar información consistente sobre la variabilidad genética entre genotipos de trigo que ayudará en los programas de mejoramiento.

**Palabras clave:** Estructura genética; Recursos genéticos; Marcadores moleculares.

## 1. Introdução

Com uma produção mundial prevista em 768,5 milhões de toneladas na safra 2020 (USDA, 2020), o trigo é o segundo cereal mais produzido no mundo, com significativo peso na economia agrícola global. Esse cereal é de extrema importância, pois faz parte do desenvolvimento econômico, além de representar uma das culturas alimentares mais importantes do mundo. Desta forma, programas de melhoramento genético são de vital importância para o aumento da produtividade dessa cultura (Igrejas & Branlard, 2020).

A caracterização e avaliação preliminar do germoplasma, assim como, o conhecimento da diversidade genética entre acessos são essenciais para os melhoristas escolherem as melhores estratégias para a incorporação de diversidade útil em seus programas de melhoramento, facilitando a introgressão de genes de interesse nas cultivares comerciais de trigo, além de entender as relações evolutivas entre os diferentes acessos (Eujay et al., 2001; Sofalian et al., 2008; Khan et al., 2014).

Marcadores moleculares têm sido utilizados em estudos de genética, como em análises de similaridade, diversidade genética, em mapeamento e seleção assistida em germoplasma de trigo. A diversidade genética por meio de marcadores moleculares apresenta algumas vantagens, pois, além de identificar maior polimorfismo, não apresentam interações com o ambiente e pode ser avaliada em qualquer fase de desenvolvimento (Williams et al., 1990; Jesus et al., 2020). Técnicas baseadas na reação em cadeia da polimerase (PCR), como os ISSRs (*Inter Simple Sequence Repeat*) têm sido amplamente utilizadas em estudos genéticos

de trigo (Zhu et al., 2011; El-Assal & Gaber, 2012; Rizkalla et al., 2012; Zamanianfard et al., 2015; Etminan et al., 2017).

Marcadores ISSRs proporcionam um sistema rápido, barato e eficaz para estudar as relações genéticas (Etminan et al., 2016). Eles são particularmente interessantes uma vez que não necessitam do conhecimento prévio da sequência de DNA. Os ISSRs têm sido aplicados com sucesso em estudos sistemáticos de plantas, especialmente na identificação da variabilidade genética em germoplasma e na mensuração da variação para estabelecer relações evolutivas dentro ou entre espécies, subespécies ou populações e genomas (El-Assal & Gaber, 2012; Shaygan et al., 2020). Os marcadores ISSRs são encontradas em regiões genômicas de 100 a 3.000 pb, flanqueados por sequências de microssatélites, no qual são desenhados *primers* únicos e amplificados via PCR para gerar marcadores multilocos e dominantes (Yang et al., 1996; Faleiro, 2007). Diferentes estudos mostraram que marcadores ISSR forneceram suficiente polimorfismo e perfis de *fingerprinting* reproduzíveis para avaliar a diversidade genética de genótipos de trigo (Najaphy et al., 2012; Nazarzadeh et al., 2020).

O presente trabalho possui cunho de relevância para os programas de melhoramento genético de trigo, cujos objetivos imediatos são a caracterização de acessos dos bancos de germoplasma e uma melhor compreensão da eficácia dos marcadores moleculares, que é um pré-requisito para a seleção assistida por marcadores. Isso contribuirá para a obtenção de materiais genéticos superiores, mais adaptados às condições ambientais adversas, com elevada produtividade, qualidade tecnológica e estabilidade produtiva. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi caracterizar a variabilidade genética entre 33 acessos do Banco Ativo de Germoplasma de Trigo (BAGT) do Instituto de Desenvolvimento Rural do Paraná (IDR-Paraná) através dos marcadores ISSRs.

## **2. Metodologia**

### **2.1 Material Vegetal**

Foram utilizados 32 acessos de trigo (*Triticum aestivum*) e 1 triticale (acesso IPR111) (*X Triticosecale wittmack*) provenientes do Banco Ativo de Germoplasma de Trigo (BAGT) do Instituto de Desenvolvimento Rural do Paraná (IDR-Paraná), que apresentam características agronômicas dissimilares, baseados em caracterizações fenotípicas (Tabela 1). As principais características que os diferem são: qualidade, tolerância ao alumínio, ciclo, resistência a doenças e germinação na espiga.

**Tabela 1.** Genótipos de trigo (*Triticum aestivum*) e suas características agromorfológicas, utilizados na caracterização molecular.

N	Genótipo	Qualidade	Tolerância ao Alumínio	Ciclo	Resistência Brusone	Resistência Giberela	Germinação na espiga
1	Anahuac	Pão	AS	Precoce			
2	BH 1146	Pão	T	Precoce			
3	BR 18	Pão	MS	Precoce	R	S	S
4	BRS 220	Pão	MT	Médio	MS	MS	S
5	BRS Pardela	Melhorador	MT	Médio	MR	MS	MS
6	Frontana	Pão	T	Médio			R
7	GDIN*2/RL 4137	Melhorador		Médio			MR
8	ALSEN	Melhorador	MT	Medio			
9	IAPAR 30	Pão		Médio			
10	IPR 110	Doméstico	MT	Precoce			S
11	IPR 111	Doméstico	MT	Medio			
12	IPR 118	Pão	MS	Medio			MS
13	IPR 130	Pão	MS	Medio	MR	MS	MS
14	IPR 144	Pão	MS	Precoce	MR	S	MS
15	IPR 85	Melhorador	MT	Precoce	MR	MS	MR
16	IPR Catuara TM	Melhorador	MT	Precoce	MS	MS	MS
17	PLB	Doméstico		Tardio			
18	LD 101108	Melhorador	MT	Precoce	R	S	MR
19	LD 101205	Melhorador	MT	Precoce	R	S	MR
20	LD 111101	Pão		Precoce			MR
21	LD 111202	Pão		Precoce			MS
22	LD 111203	Pão		Precoce			MS
23	LD 111204	Pão		Precoce			MS
24	LD 111205	Doméstico		Precoce			MS
25	LD 112206	Pão		Medio			MS
26	LD 112207	Melhorador		Medio			MS
27	LD 112208	Pão	MS-S	Medio			MS
28	ND 674	Melhorador		Médio			
29	PLV	Doméstico		Tardio			
30	Quartzo	Pão	MR	Médio			
31	Gaivota	Pão	MT	Medio	MR	MS	
32	Gralha Azul	Melhorador	T	Medio	MS	MS	MS
33	Tangará	Pão	MT	Medio	MS	MS	MS

\*MS = Moderadamente suscetível; MR = Moderadamente Resistente; MT = Moderadamente Tolerante; S = Suscetível; R = Resistente; T = Tolerante. Espaços em branco significa que esses acessos não foram avaliados para essa característica.

Fonte: Os Autores.

## 2.2 Extração de DNA

As sementes foram colocadas para germinar em papel toalha umedecido. Após 14 dias coletaram-se as folhas jovens e o tecido foliar foi macerado em nitrogênio líquido. Cada

genótipo foi representado por um bulk de folhas jovens (Michelmores et al., 1991) de 100 plantas. O DNA genômico foi extraído de acordo com o protocolo CTAB (*Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide*) adaptado (Weising et al., 2005). Após a extração foi realizada a quantificação do material em espectrofotômetro Femto 700 Plus®, no qual a absorbância foi lida a 260 e 280 nm e diluído a uma concentração final de 5ng/μL.

### 2.3 Reações de PCR ISSRs

Foram testados 40 *primers* de ISSR, dos quais 10 foram selecionados para esse trabalho (Tabela 2). As reações de PCR foram realizadas em volume final 30 μL, contendo 1 x buffer de PCR (75 mM Tris-HCl pH 9.0, 50 mM KCl, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), 3,4 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,25 mM de cada dNTP (dCTP, dGTP, dTTP, dATP), 0,4 mM de cada *primer* (direto e inverso), 2 U de *Taq* DNA polymerase (Invitrogen®), 15 ng de DNA e água milli-Q estéril. As amplificações foram realizadas em termociclador (Eppendorf®) programado para 40 ciclos, sendo um ciclo inicial de 94 °C por 10 minutos, 40 ciclos de 94 °C por 30 segundos, a temperatura de pareamento variou para cada *primer* entre 54 °C e 58 °C por 45 segundos e 72 °C por 2 minutos e seguiu um ciclo final de extensão de 7 minutos a temperatura de 72 °C. Os produtos da amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídio (0,5 μg/mL). Os fragmentos amplificados foram separados em tampão TAE a 100 volts por 4 horas e visualizados sob luz U.V. As imagens dos géis foram capturadas usando um sistema de fotodocumentação para posterior análise.

### 2.4 Análise estatística de dados ISSRs

A partir da avaliação dos géis, foi construída uma matriz de similaridade onde cada banda foi tratada como um caráter único e a sua presença em um indivíduo foi designada por 1 (um) e a ausência por 0 (zero). Foi utilizado o software NTSYS pc v. 2.11X (Rolf, 2000) para avaliar as relações genéticas entre os genótipos. Com base no coeficiente de similaridade de Jaccard, foram feitas comparações duas a duas, entre os genótipos. A estimativa da similaridade genética (SG) entre cada par de genótipos foi efetuada através da expressão  $SG_{ij} = a/(a+b+c)$ , onde  $a$ =número de coincidências positivas para cada par,  $b$ =número de discordâncias do tipo 1-0 para cada par de genótipos e  $c$ =número de discordâncias do tipo 0-1

para cada par de genótipo, enquanto a dissimilaridade genética (DG) foi obtida através da expressão  $DG=1-SG$ . A representação simplificada das distâncias foi feita por meio de um dendrograma obtido pelo método hierárquico aglomerativo da média aritmética entre pares não ponderados (UPGMA). O coeficiente de correlação cofenética (CCC) entre a matriz de similaridades genéticas e a matriz dos valores cofenéticos foi estimado com o objetivo de verificar a consistência do agrupamento.

O agrupamento bayesiano foi realizado a partir dos dados dos marcadores de ISSRs, com o auxílio do software Structure V 2.3.4 (Pritchard et al., 2000), baseado no método descrito por Evanno et al. (2005), com 100.000 interações MCMC (Markov Chain Monte Carlo), com um *burn-in* de 10.000 interações, assumindo um cluster misto para o modelo de mistura e de frequências de alelos correlacionadas. Valores de  $k$  de 1 a 10 foram testados, com 10 interações independentes para cada valor de  $k$ . O número  $k$  foi determinado usando o programa Structure Harvester v0.6.92 (Earl & von Holdt, 2012) e o gráfico gerado pela interface online Structure Plot 2 (Ramasamy et al., 2014).

### 3. Resultados e Discussão

A caracterização molecular é uma importante ferramenta para avaliar a variação genética nos recursos genéticos vegetais. Nesse estudo, os 10 primers ISSR testados, geraram um total de 66 loci polimórficos (90%) e 7 loci monomórficos (10%) (Tabela 2), com média total de 7,3 bandas por *primer*. O nível de polimorfismo encontrado no presente trabalho para os marcadores ISSR (90%) foi superior ao encontrado por Abou-Deif et al. (2013) que caracterizaram geneticamente 20 variedades de trigo utilizando 8 *primers* de ISSRs e obtiveram 84,8% de polimorfismo. Ghazalli et al. (2015) em seu estudo com marcadores ISSR, a partir de 10 *primers* testados obtiveram polimorfismo médio de 54,9%. Um aspecto a considerar é que, visando o número e a qualidade dos produtos de amplificação, os iniciadores utilizados foram rigorosamente pré-selecionados, o que pode ter contribuído para a elevação do nível de polimorfismo encontrado nesse trabalho. Outro fato a ser levado em consideração é que as variações encontradas quanto ao nível de polimorfismo podem ser resultado de diferenças entre o material utilizado e/ou regiões distintas do DNA do trigo que foram acessados pelos marcadores utilizados nesse estudo.

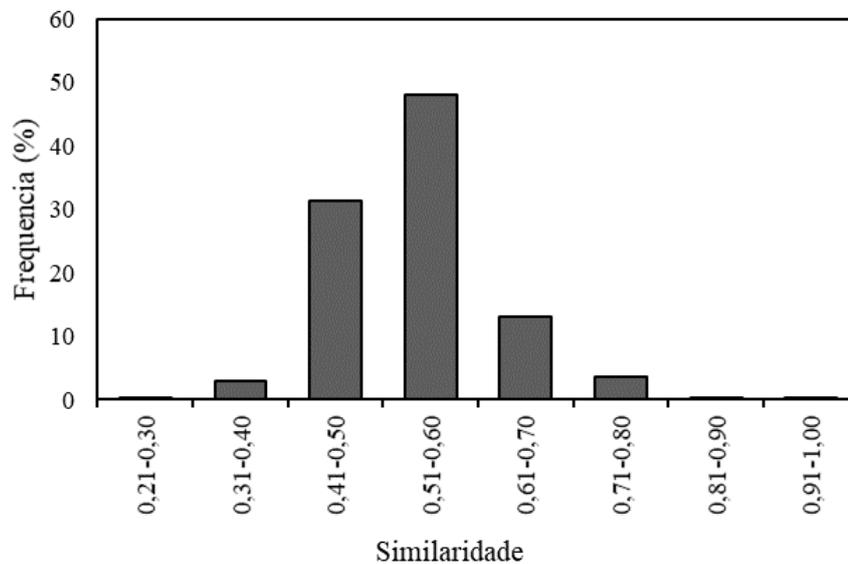
**Tabela 2.** *Primers* ISSRs selecionados, *motif*, temperatura de anelamento, sequência do primer, número de loci monomórficos e polimórficos e total de loci amplificados.

<i>Primers</i>	<i>Motif</i>	Temperatura de Anelamento	Sequência do Primer	Loci Monomórficos	Loci Polimórficos	Total de Loci
UBC-805	(TA)8 C	54 °C	TATATATATATATATAC	1	7	8
UBC-807	(AG)8 T	58 °C	AGAGAGAGAGAGAGAGT	0	9	9
UBC-809	(AG)8 G	58 °C	AGAGAGAGAGAGAGAGG	0	4	4
UBC-818	(CA)8G	54 °C	CACACACACACACACAG	1	8	9
UBC-834	(AG)8 YT	54 °C	AGAGAGAGAGAGAGAGYT	1	5	6
UBC-836	(AG)8 YA	54 °C	AGAGAGAGAGAGAGAGYA	2	5	7
UBC-840	(GA)8 YT	58 °C	GAGAGAGAGAGAGAGAYT	0	6	6
UBC-842	(GA)8 YG	58 °C	GAGAGAGAGAGAGAGAYG	0	6	6
UBC-847	(CA)8 RC	58 °C	CACACACACACACARC	1	8	9
UBC-880	(GGAGA)3	54 °C	GGAGAGGAGAGGAGA	1	8	9
<b>Média</b>				0,7	6,6	7,3
<b>Total</b>				7 (10%)	66 (90%)	73 (100%)

Fonte: Autores.

Uma matriz de similaridade genética foi construída a partir dos marcadores ISSRs utilizando o coeficiente de Jaccard. O coeficiente de similaridade variou de 0,29 a 0,93, com média de 0,57 (Figura 1). A menor similaridade (0,29) foi observada entre os genótipos LD 101205 e IAPAR 30 entre os quais não se observou semelhanças agromorfológicas. A maior similaridade (0,93) foi observada entre os genótipos LD 111202 e LD 111203, esses genótipos apresentam exatamente as mesmas características agromorfológicas. Isso era esperado uma vez que são linhagens irmãs provenientes dos mesmos parentais. Estes dados mostram que os marcadores ISSR foram capazes de detectar a diversidade genética existente entre os acessos de trigo utilizados neste estudo. Esses resultados são corroborados por outros autores que mostraram que os ISSRs possuem uma boa capacidade de explorar a diversidade mostrando maior polimorfismo e consequentemente maior variabilidade (Chowdhury et al., 2008; Carvalho et al., 2009; Rizkalla et al., 2012; Saleh et., 2017).

**Figura 1.** Frequencia de distribuição dos valores dos coeficientes de similaridade entre os 33 acessos de trigo obtidas a partir dos marcadores ISSR utilizando o coeficiente de Jaccard.

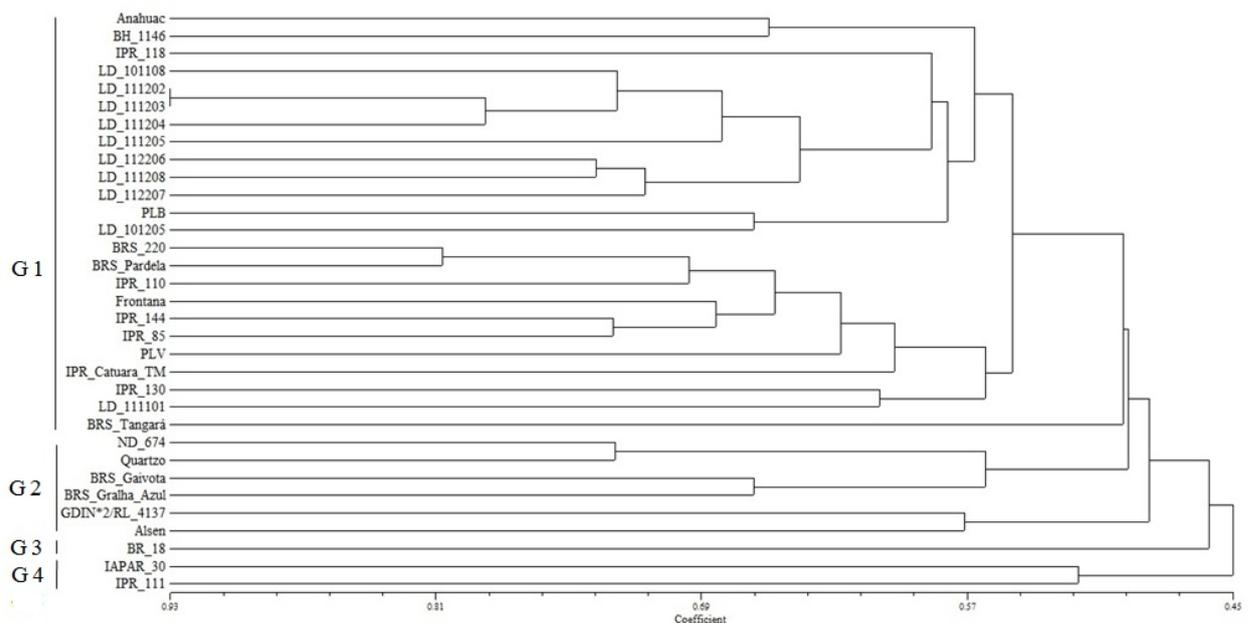


Fonte: Autores.

Um dendrograma baseado no valor de similaridade originado a partir dos marcadores de ISSR foi construído usando o agrupamento UPGMA, a fim de ilustrar a associação entre os cultivares utilizados neste estudo. O dendrograma resultante (Figura 2) dividiu-se em quatro principais grupos, os acessos pertencentes ao grupo 1 são: Anahuac, BH 1146, IPR 118, LD 101108, LD 111202, LD 111203, LD 111204, LD 111205, LD 112206, LD 112208, LD 112207, PLB, LD 101205, BRS 220, BRS Pardela, IPR 110, Frontana, IPR 144, IPR 85, PLV, IPR Catuara TM, IPR 130, LD 111101 e BRS Tangará. Essas variedades apresentam diferentes características quanto a qualidade do grão de trigo (pão, melhorador e doméstico), a tolerância ao alumínio, resistência à brusone e giberela e ciclo reprodutivo (precoce, tardio e médio) e germinação da espiga. As variedades presentes no grupo 2 são: ND 674, Quartzo, BRS Gaivota, BRS Gralha Azul, GDIN\*2/RL 4137 e Alsen. Os acessos do grupo 2 apresentam as mesmas características para o ciclo reprodutivo (médio). Isolado dos demais grupos está o acesso BR18 (grupo 3) que possui características agromorfológicas diferentes dos demais acessos. Duas variedades representam o grupo 4: IAPAR 30 e IPR 111 (triticale). Desta forma, os genótipos apresentaram um alto nível de diversidade genética sendo incluídos em diferentes grupos no dendrograma gerado. A correlação cofenética obtida para o marcador ISSR foi elevada com  $r = 0,75$ , o que confere confiabilidade aos resultados.

Diferentes autores mostraram que os marcadores ISSR são úteis em fornecer informações consistentes sobre a diversidade genética existente entre diferentes genótipos de trigo, como observado nesse trabalho (Nagaoka & Ogihara, 1997; Ammiraju et al., 2001; Carvalho et al., 2009; El-Assal & Gaber, 2012). Marcadores ISSR, apresentam-se como uma técnica bastante estável, geram um grande número de fragmentos polimórficos e apresentam um custo relativamente baixo (Mattioni et al., 2002; Yang et al., 1996). Zamanianfard et al. (2015) mostraram que os marcadores ISSR são informativos e adequados para fins de impressão digital e podem ser eficientemente utilizados para avaliar a variação genética em bancos de germoplasma de trigo.

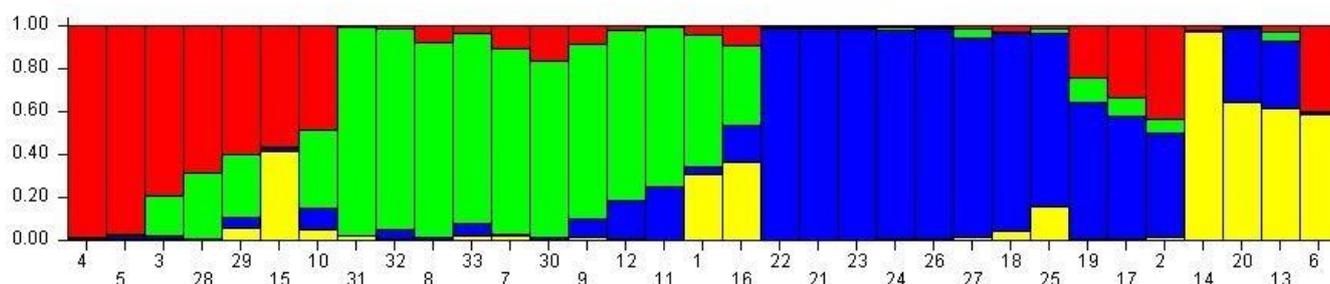
**Figura 2.** Dendrograma de similaridade genética usando marcador ISSRs entre os 33 genótipos através do coeficiente de Jaccard pelo método UPGMA.



Fonte: Autores.

A partir das simulações realizadas pelo software Structure e da metodologia do valor  $\Delta k$  (Evanno et al., 2005) foi possível observar que os acessos de trigo se dividiram em quatro grupos (Figura 3). O grupo I (vermelho), grupo II (verde), grupo III (azul) e grupo IV (amarelo) foi composto por 5, 10, 9 e 4 acessos, respectivamente. Entretanto, 5 acessos (IPR 85, IPR 110, IPR Catuara TM, PLB e BH 1146) foram classificados como uma mistura, pois o coeficiente de adesão foi inferior a 0,6, permitindo a inclusão de loci comuns em mais de um grupo. Os grupos formados pela análise bayesiana foram parcialmente consistentes com os grupos formados pelo agrupamento de UPGMA.

**Figura 3.** Distribuição dos 33 genótipos de trigo pelo gráfico *bar plot* baseado em marcadores ISSR. As quatro cores representam os diferentes clusters. O eixo x exibe o percentual estimado de cada genótipo no seu determinado cluster. (1) Anahuac; (2) BH 1146; (3) BR18; (4) BRS 220, (5)BRS Pardela; (6) Frontana; (7) GDIN\*2/RL 4137; (8) Alsen; (9)IAPAR 30; (10) IPR 110; (11) IPR 111; (12) IPR 118; (13) IPR 130; (14) IPR 144; (15) IPR 85; (16) IPR Catuara TM; (17) PLB; (18) LD 101108; (19) LD 101205; (20) LD 111101; (21) LD 111202; (22) LD 111203; (23) LD 111204; (24) LD 111205; (25) LD 112206; (26) LD 112207; (27) LD 112208; (28) ND 674; (29) PLV; (30) Quartzoz; (31) BRS Gaivota; (32) BRS Gralha Azul; (33) BRS Tangará.



Fonte: Autores.

Os marcadores ISSR utilizados neste estudo mostraram-se bastante eficazes na determinação das variações genéticas entre os genótipos de trigo. Esses resultados estão de acordo com estudos anteriores obtidos por outros autores utilizando diferentes germoplasmas de trigo (Zeb et al., 2009; Mangini et al., 2010; Varsha et al., 2018; Nazarzadeh et al., 2020; Shaygan et al., 2020). Além disso, o presente estudo demonstrou que existe variabilidade genética no banco de germoplasma de trigo. A variabilidade genética é um indicador de que os critérios de seleção exercida pelos agricultores ou pelo ambiente foram diferentes ao longo dos anos. Isso era esperado uma vez que os genótipos utilizados são geneticamente heterogêneos. Este resultado é uma situação desejável, uma vez que a variabilidade genética dentro de um banco de germoplasma é interessante por apresentar aplicações práticas como a conservação dos recursos genéticos e para fins de melhoramento de plantas prevendo as melhores combinações genéticas.

#### 4. Conclusão

Em conclusão, os resultados apresentados nesse trabalho demonstraram que os marcadores ISSR são capazes de discriminar acessos morfológicamente distintos e similares,

além de fornecer informações consistentes sobre a variabilidade genética existente entre os genótipos de trigo. Com esse trabalho foi possível estabelecer um conjunto de diferentes marcadores polimórficos que poderão ser utilizados para a identificação de genótipos o que, conseqüentemente, facilitará a gestão do germoplasma e no direcionamento de cruzamentos entre os parentais com alta complementaridade genética e adaptados às condições adversas do meio ambiente.

### **Agradecimentos**

Os autores agradecem à UNIPAR e à Fundação Araucária pelo suporte financeiro à pesquisa e à CAPES e CNPq pelas bolsas de estudos.

### **Declaração de divulgação**

Os autores declaram não haver competição de interesse e permitem a divulgação.

### **Referencias**

Abou-Deif, M. H., Rashed, M., Sallam, M., Mostafa, E., Ramadan, W. (2013). Characterization of Twenty Wheat Varieties by ISSR Markers. *Middle-East, Journal of Scientific Research*, 15 (2), 168-175.

Ammiraju, J. S. S., Dholakia, B. B., Santra, D. K., Singh, H., Lagu, M. D., Tamhankar, S. A., Dhaliwal, H. S., Rao, V. S., Gupta, V. S., Ranjekar, P. K. (2001). Identification of inter simple sequence repeat (ISSR) markers associated with seed size in wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 102 (5), 726-732.

Carvalho, A., Lima-Brito, J., Maçãs, B., Guedes-Pinto, H. (2009). Genetic diversity and variation among botanical varieties of old portuguese wheat cultivars revealed by ISSR assays. *Biochemical Genetics*, 47 (3-4), 276-294.

Chowdhury, R. M. V. K., Kundu S. J. S. & Jain, R. K. (2008). Applicability of ISSR markers for genetic diversity evaluation in Indian bread wheat genotypes of known origin. *Environmental Ecology*, 26, 126-131.

Earl, D. A. & von Holdt, B. M. (2012). Structure Harvester: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*, 4, 359-361.

El-Assal, S. E. D. & Gaber, A. (2012). Discrimination capacity of RAPD, ISSR and SSR markers and of their effectiveness in establishing genetic relationship and diversity among Egyptian and Saudi wheat cultivars. *American Journal of Applied Sciences*, 9 (5), 724-735.

Etminan, A., Pour-Aboughadareh, A., Mohammadi, R., Ahmadi-Rad, A., Noori, A., Mahdavian, Z., Moradi, Z. (2017). Evaluation of genetic diversity in a mini core collection of Iranian durum wheat germplasms. *Journal of animal and Plant Sciences*, 27, 1582-1587.

Eujayl, I., Sorrells, M., Baum, M., Wolters P., Powell W. (2001). Assessment of genotypic variation among cultivated durum wheat based on EST-SSRs and genomic SSRs. *Euphytica*, 119 (1), 39-43.

Evanno, G., Regnaut, S. & Goudet, J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular ecology*, 14 (8), 2611–2620.

Etminan, A., Pour-Aboughadareh, A., Mohammadi, R., Ahmadi-Rad, A., Noori, A., Mahdavian, Z. & Moradi Z. (2016). Applicability of start codon targeted (SCoT) and inter-simple sequence repeat (ISSR) markers for genetic diversity analysis in durum wheat genotypes. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 30 (6), 1075-1081.

Faleiro, F. G. (2007). *Marcadores genético-moleculares aplicados aos programas de conservação e uso de recursos genéticos*. Planaltina: Embrapa Cerrados.

Ghazalli, M. N., Yunus M. F. & Mohammad, A. L. (2015). Assessment of genetic relationships within *Bouea* (Anacardiaceae) accessions in Peninsular Malaysia using Inter Simple Sequence Repeats (ISSR) markers. *African Journal of Biotechnology*, 14 (2), 76-85.

Igrejas, G. & Branlard, G. (2020). The Importance of Wheat. In: Igrejas G., Ikeda T., Guzmán C. (eds). *Wheat Quality For Improving Processing And Human Health*. Springer Nature Switzerland AG.

Jesus, A. A. de, Bueno, L. G., Vega, W. H. O., & Diniz, F. M. (2020). Moleculares tools in genetic breeding of *Megathyrus maximus* for semiarid region: a review. *Research, Society and Development*, 9(10), e7839108675.

Saleh, O.M., Hamiedeldin, N., Khafaga A.F., Rashad, M., Shoaib, R.M. (2017). Molecular, Morphological and Anatomical Characterization for Some Egyptian Durum Wheat. *Life Science Journal*, 14(2), 91-104.

Khan, M. K., Pandey, A., Choudhary, S., Hakki, E. E, Akkaya, M. S., Thomas, G. (2014). From RFLP to DArT: molecular tools for wheat (*Triticum* spp.) diversity analysis. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 61 (5), 1001-1032.

Mangini, G., Taranto, F., Giove, S., Gadaleta, A., Blanco, A. (2010). Identification of Durum Wheat Cultivars by a Minimum Number of Microsatellite Markers. *Cereal Research Communications*, 38 (2), 155-162.

Mattioni, C., Casasoli, M., Gonzalez, M., Ipinza, R., Villani, F. (2002). Comparison of ISSR and RAPD markers to characterize three chilean nothofagus species. *Theoretical and Applied Genetics*, 104 (6-7), 1064-1070.

Michelmore, R. W., Paran, I., Kesseli, R. V. (1991). Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88 (21), 9828-9832.

Najaphy, A., Parchin, R. A., Farshadfar, E. (2012). Comparison of phenotypic and molecular characterizations of some important wheat cultivars and advanced breeding lines. *Australian Journal of Crop Science*, 6 (2), 326-332.

Nagaoka, T., & Ogihara, Y. (1997). Applicability of Inter-Simple Sequence Repeat polymorphisms in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 94 (5), 597-602.

Nazarzadeh, Z., Onsoni, H., & Akrami, S. (2020). Genetic Diversity of Bread Wheat (*Triticum aestivum* L.) Genotypes Using RAPD and ISSR Molecular Markers, *Journal of Genetic Resources*, 6 (1), 69-76.

Pritchard, J. K., Stephens, M., & Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155 (2), 945–959.

Ramasamy, R. K., Ramasamy, S., Bindroo, B. B., Naik, V. G. (2014). Structure Plot: a program for drawing elegant STRUCTURE bar plots in user friendly interface. *Springer Plus*, 3 (1), 431.

Rizkalla, A. A., Attia, S. A. A., El-Hady, E. A. A. A., Hanna, N. S.; Nasseef, J. E. (2012). Genetic diversity based on ISSR and protein markers associated with earliness trait in wheat. *World Applied Sciences Journal*, 20 (1), 23-33.

Rolf, F. J. (2000). *NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system*. Version 2.1. New York: Exeter Software.

Shaygan, N., Etminan, A., Majidi Hervan, I., Azizinezhad R., Mohammadi, R. (2020). The study of genetic diversity in a minicore collection of durum wheat genotypes using agromorphological traits and molecular markers. *Cereal Research Communications*, <https://doi.org/10.1007/s42976-020-00073-6>.

Sofalian, O., Chaparzadeh, N., Javanmard, A., Hejazi, M.S. (2008). Study the genetic diversity of Wheat Landraces from Northwest of Iran Based on ISSR Molecular Markers. *International Journal of Agriculture & Biology*, 10 (4), 465–468.

USDA. United States Department of Agriculture. Recuperado de < <https://www.fas.usda.gov/data/grain-world-markets-and-trade>>

Varsha, Y., Pardeep, K. & Meenu, G. (2018). Evaluation of genetic diversity in drought tolerant and sensitive varieties of wheat using ISSR markers, *Electronic Journal of Plant Breeding*, 9 (1), 146-153.

Weising, K., Nybom H., Pfenninger, M., Wolff, K., Kahl, G. (2005). *DNA fingerprinting in plants: principles, methods, and applications*. (2a ed.), CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton.

Williams, J. G., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A., Tingey, S. V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Reserch*, 18 (22), 6531-5.

Yang, W., Oliveira, A. C., Godwin, I., Schertz, K., Bennetzen, J. L. (1996). Comparison of DNA marker technologies in characterizing plant genome diversity: variability in Chinese sorghums. *Crop Science*, 36 (6), 1669-1676.

Zamaniafard, Z., Etminan, A., Mohammadi, R., Shooshtari, L. (2015). Evaluation of molecular diversity of durum wheat genotypes using ISSR markers. *Biological Forum – An International Journal*, 7 (1), 214-218.

Zeb, B., Khan, I., Ali, S., Bacha, S., Mumtaz, S., Swati, Z. (2009). Study on genetic diversity in Pakistani wheat varieties using simple sequence repeat (SSR) markers. *African Journal of Biotechnology*, 8 (17), 4016-4019.

Zhu, Y., Hu, J., Han, R., Wang, Y., Zhu S. (2011). Fingerprinting and identification of closely related wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars using ISSR and fluorescence-labeled TP-M13-SSR markers. *Australian Journal of Crop Science*, 5 (7), 846-850.

**Porcentagem de contribuição de cada autor no manuscrito**

Polyana Barros Polido – 30%

Cristine Bonacina – 15%

Tania Mayumi Ito – 15%

Deoclécio Domingos Garbúglío – 20%

Silvia Graciele Hülse de Souza – 20%