

ANÁLISE DE DIVERSIDADE GENÉTICA EM NOVE ACESSOS DE *Saccharum* spp. UTILIZANDO MARCADORES SSR E EST-SSR

Joseli Cristina da Silva¹; Hugo Zeni Neto²; Letícia Martins Montini³; Luíz Gustavo da Mata Borsuk⁴; Renato Frederico dos Santos⁵

¹Doutoranda do Curso de Pós-graduação em Genética e Melhoramento de Plantas – Universidade Estadual de Maringá - UEM. Bolsista CAPES. josycrisilva@hotmail.com

²Orientador, Doutor, Professor do Departamento de Agronomia, Universidade Estadual de Maringá - UEM. hzneto@uem.br

³Mestranda do Curso de Pós-graduação em Agronomia – Universidade Estadual de Maringá - UEM. montinileticia@outlook.com

⁴Mestrando do Curso de Pós-graduação em Genética e Melhoramento de Plantas – Universidade Estadual de Maringá - UEM. lgborsuk@hotmail.com

⁵Doutorando do Curso de Pós-graduação em Agronomia, Universidade Estadual de Maringá - UEM. Bolsista CNPq-UEM. agrorfs@hotmail.com

RESUMO

A cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) é uma das culturas mais importantes no cenário mundial e vem ganhando cada vez mais espaço nos Centros de Pesquisas que buscam explorar seu complexo genoma. O uso dos marcadores moleculares no melhoramento genético de plantas visam a obtenção de cultivares cada vez mais superiores e que tenham eficiência na transferência de genes. Além disso, contribuem para estimar a diversidade genética, que mede o grau de variedades de genes existentes dentro de uma espécie, e com isso, colaboram para um melhor entendimento acerca deste genoma. A diversidade genética de nove acessos de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) foi acessada por meio da similaridade genética, através do coeficiente de *Jaccard*, utilizando marcadores moleculares polimórficos (SSR e EST-SSR). Dentre os nove acessos analisados observou-se que houve um maior coeficiente de similaridade entre os acessos 6 e 9; 1 e 8; e 2 e 7 (100%) enquanto os acessos 6 e 4, apresentaram um menor grau de similaridade entre si (16,64%). Com isso, os resultados apresentados, indicam que o uso de marcadores microssatélites SSR e EST-SSR foram úteis para a análise da diversidade genética na cana-de-açúcar.

PALAVRAS-CHAVE: Cana-de-açúcar; Marcadores polimórficos; Melhoramento vegetal; Similaridade.

1 INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*), planta alógama, perene, pertence à tribo Andropogoneae, família Poaceae e ao gênero *Saccharum* (Cronquist, 1981). É considerada como uma das principais culturas no cenário da agricultura, tanto em nível nacional como internacional. No Brasil ela está sendo cultivada desde o início da colonização e se tornou uma das mais importantes cadeias produtivas do agronegócio Brasileiro devido à alta produção de açúcar, etanol (Garsmeur et al., 2018); cachaça (Oliveira et al., 2001) e de bioprodutos como papel, cartão e plástico, provenientes das fibras do bagaço da cana (Ligowski et al., 2015).

Os estudos de diversidade genética são de extrema importância para a definição das melhores combinações de cruzamentos entre os genitores (Peternelli et al., 2009). E, segundo Mohammadi e Prasanna (2003) a diversidade genética se refere a toda variação biológica hereditária acumulada durante o processo evolutivo e corresponde ao número total de características genéticas na composição genética das espécies ou subespécies.

Os marcadores moleculares se destacam por contribuir para o melhoramento genético possibilitando a análise da diversidade genética em cruzamentos de clones parentais ou materiais de germoplasma silvestre e os marcadores microssatélites, passam a contribuir para a compreensão de toda a complexidade genética que contém a cana-de-açúcar, no intuito de alcançar características agrônômicas desejáveis (Aitken et al., 2005; Borém & Caixeta 2016).

Dentre os marcadores, as SSRs (*Simple sequence Repeat*) e as ESTs (*Expressed Sequence Tag*) são os mais indicados para os estudos de diversidade genética (Ukoskit et al., 2012; Singh et al., 2017). Neste sentido, buscou-se por meio do uso de marcadores microssatélites polimórficos (SSR e EST-SSR) avaliar a divergência genética em seis acessos de cana-de-açúcar, através do coeficiente de similaridade de *Jaccard*. A

divergência genética pode ser estimada a partir de marcadores agrônômicos, bioquímicos, morfológicos e moleculares tendo este, a vantagem de não ser influenciado pelo ambiente e apresentar a possibilidade de estarem ligados a locos que determinam características de interesse.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

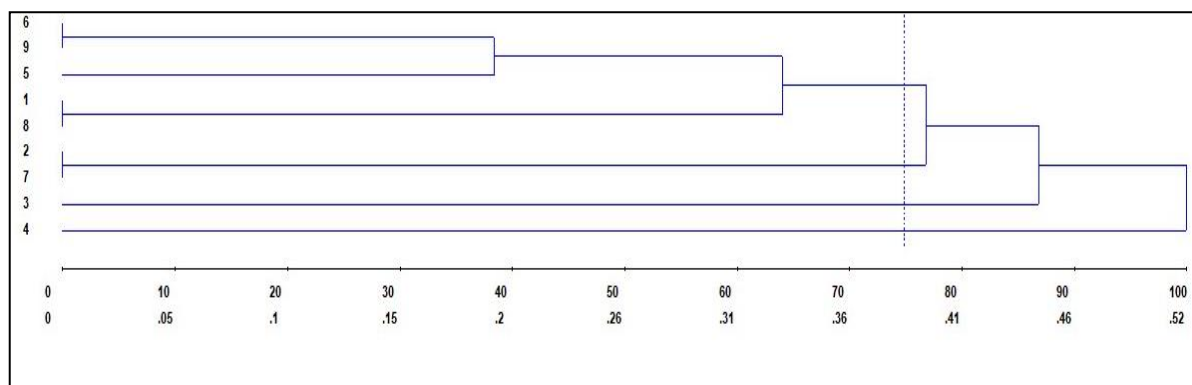
Os acessos de cana-de-açúcar foram provenientes de um Programa de Melhoramento da RIDESA e numerados de 1 a 9. O material extraído foi proveniente de folhas jovens e sadias, o DNA Genômico foi obtido de acordo com o protocolo descrito por Hoisington et al. (1994) com as adequações que foram necessárias, o *pellet* de DNA ressuspenso em 50 μ L de TE, os tubos vedados com parafilm® e armazenados em geladeira com 4°C.

A quantificação do DNA obtido foi realizada em espectrofotômetro NanoDrop (ND-1000, versão 3.1.1 EUA) e as amostras de DNA foram então diluídas para a amplificação por reação em cadeia de polimerase (PCR) utilizando o programa *Touchdown*. Foram utilizados 14 marcadores microssatélites sintetizados pela invitrogen®, sendo 10 SSRs e quatro ESTs como se segue: SMC477CG, SMC226CG, SMC863C6, SMCFL2017, UGSM44, UGSM96, SEGMS147, SEGMS20, SEGMS47, MSSCIR44, ESTC113, ESTC69, ESTC66 e ESTB60. As amplificações foram realizadas em gel de agarose 4%, corado com brometo de etídio e fotodocumentadas pelo dispositivo *Loccus Biotecnologia™ TRANSILLUMINATION* (L. PIX). A divergência genética entre os acessos foi calculada utilizando o coeficiente de *Jaccard* (1908) e o agrupamento utilizado foi o UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method using Arithmetic averages*). Um dendrograma foi construído utilizando o programa GENES, com 1000 repetições de *bootstrap*. E, para a determinação do ponto de corte no dendrograma, foi utilizado o método de Mojena (1977), que é um procedimento baseado no tamanho relativo dos níveis de fusões ou distâncias no dendrograma.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram formados quatro grupos com carga superior a 75% (Linha de Mojena), que demonstram a diferenciação entre os clusters resultantes, com uma consistência de formação dos grupos maior de 55%, dada pelas simulações de *bootstrap*. A análise dos dados mostrou que o grau de similaridade variou de 0,1667 (menor similaridade) a 1,00 (maior similaridade). De acordo com a Figura 1 é possível verificar que os acessos 6 e 9; 1 e 8; e 2 e 7 foram os mais similares geneticamente possuindo 100% (1,0) de similaridade e os acessos 6 e 4 demonstram então uma maior dissimilaridade entre si 16,67% (0,1667)

Figura 1: Dendrograma obtido pelo método UPGMA, a partir da similaridade genética obtida pelo método de *Jaccard* para os nove acessos de cana-de-açúcar.



Marcadores Microsatélites são extremamente úteis para a análise da diversidade genética, pois eles permitem discriminar geneticamente o indivíduo e, além disso, inferem sobre a magnitude de variação entre clones com base em seus parentescos (OLIVEIRA et al., 2009; DUARTE et al., 2010)

4 CONCLUSÃO

A aplicação do método de UPGMA aos dados da cana-de-açúcar permitiu concluir sobre a existência de quatro grupos utilizando a linha de Mojena. Conforme observado, a utilização de 14 marcadores entre os nove acessos de cana-de-açúcar, apresentaram um alto grau de dissimilaridade genética entre os acessos 6 e 4. Com isso, conclui-se que esta diferença genotípica entre eles relata um potencial para serem explorados como futuras séries em algum programa de melhoramento. Os resultados apresentados indicam que o uso de marcadores microsatélites SSR e EST-SSR foram úteis para a análise da diversidade genética na cana-de-açúcar.

REFERÊNCIAS

- AITKEN, K.S.; JACKSON, P.A.; MCINTYRE, C.L. A combination of AFLP and SSR markers provides extensive map coverage and identification of homo(eon) logous linkage groups in a sugarcane cultivar. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 110, p. 789–801, 2005.
- BORÉM, A.; CAIXETA, E.T. **Marcadores Moleculares**. Viçosa, MG: Ed. UFV. p.36-56. 2016.
- CRONQUIST, A. An Integrated System of Classification of Flowering Plants. New York, NY: **Columbia University Press**, 1262 p., 1981.
- DUARTE, L.S.C.; SILVA, P.P.; SANTOS, J.M.; BARBOSA, G.V.S.; RAMALHO-NETO, C.E.; SOARES, L.; ANDRADE, J.C.F.; ALMEIDA, C. Genetic similarity among genotypes of sugarcane estimated by SSR and coefficient of parentage. **Sugar Tech**, v.1, n.2, p. 145–149, 2010.
- GARSMEUR, O.; DROC, G.; ANTONISE, R.; GRIMWOOD J.; POTIER, B.; AITKEN, K.; JENKINS, J.; MARTIN, G.; CHARRON, C.; HERVOUET, C.; COSTEL, L.; YAHIAOUI, N.; HEALEY, A.; SIMS, D.; CHERUKURI, Y.; SREEDASYAM, A.; KILIAN, A.; CHAN, A.; VAN SLUYS, MARIE-ANNE; SWAMINATHAN, K.; TOWN, C.; BERGÈS, H.; SIMMONS, B.; GLASZMANN, J.C.; VOSSEN, E. VAN DER; HENRY, R.; SCHMUTZ, J.; D'HONT, A. A mosaic monoploid reference sequence for the highly complex genome of sugarcane. **Nature Communication**, v.9. p. 268, 2018.
- HOISINGTON, D.; KHAIRALLAH, M.; GONZALEZ DE LEON, D. Laboratory Protocols: CIMMYT, Applied Molecular Genetic Laboratory. 2nded. México, **Cimmyt**, 88p., 1994.
- JACCARD, P. Nouvelles recherches sur la distribution florale. **De la Societé Vaudoise des Sciences Natureles**, v. 44, p.223-270, 1908.
- LIGOWSK, E.; SANTOS, B.C. dos.; FUJIWARA, S.T. Materiais compósitos a base de fibras da cana-de-açúcar e polímeros reciclados obtidos através da técnica de extrusão. **Polímeros**, v. 25, n.1, p. 70-75, 2015.

MOHAMMADI, S.A.; PRASANNA, B.M. Review and interpretation analysis of genetic diversity in crop plants—Salient Statistical Tools. **Crop Science**, v. 43, p. 1235–1248, 2003.

MOJENA, R. Hierarchical grouping methods and stopping rules: an evaluation. **The Computer Journal**, v. 20, p. 359-363, 1977.

OLIVEIRA, A.F.; ANEFALOS, L.C.; GARCIA, L.A.F.; ISTACE, M; BURNQUIST, H.L. Sistema agroindustrial da cachaça e potencialidades de expansão das exportações. **Anais**. Ribeirão Preto: [s.n.], 2001.

OLIVEIRA, K.M.; PINTO, L.R.; MARCONI, T.G.; MOLLINARI, M.; ULIAN, E.C.; CHABREGAS, S.M.; FALCO, M.C.; BURNQUIST, W.; GARCIA, A.A.F.; SOUZA, A.P. Characterization of new polymorphic functional markers for sugarcane. **Genome**, v. 52, n. 2, p. 191-209, 2009.

PETERNELLI, L.A.; SOUZA, E.F.M.; BARBOSA, M.H.P.; CARVALHO, M.P. Delineamentos aumentados no melhoramento de plantas em condições de restrições de recursos. **Ciência Rural**, v. 39, n. 9, p. 2425-2430, 2009.

SINGH, P.; SINGH, S. P.; TIWARI, A. K.; SHARMA, B.L. Genetic diversity of sugarcane hybrid cultivars by RAPD markers. **Biotechnology**, v. 7, p. 222, 2017.

UKOSKIT, K.; PENJUN T.; PRASERT C. Novel expressed sequence tag-simple sequence repeats (EST-SSR) markers characterized by new bioinformatic criteria reveal high genetic similarity in sugarcane (*Saccharum* spp.) breeding lines. **Afri. Journal of Biotechnology**, v. 11, p. 1337–1363, 2012.