

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

DIVERSIDADE GENÉTICA EM GENÓTIPOS DE GERGELIM (*Sesamum indicum* L.) POR MEIO DE MARCADORES MOLECULARES

Fernanda Ianuxauskas Dechechi¹, Paula da Silva Mendel Soares¹, Guilherme Ferreira Sirtoli¹, Matheus Montozo Correa Silva¹, Rodrigo Monte Lorenzoni², Taís Cristina Bastos Soares³, Franciele Barros de Souza Sobreira³

¹Universidade Federal do Espírito Santo/, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, Alto Universitário, s/n, Guararema – 29500-000 – Alegre - ES, Brasil, fernandadechechi@hotmail.com, paula.mendel@hotmail.com, guilhermeferreirasirtoli@gmail.com, theusmontozo@gmail.com

²Sebra Agrícola S.A., Departamento de Pesquisa e Desenvolvimento, Lote Canarana I, Chácara G08, 78640-000 – Canarana -MT. rodrigomlorenzoni@gmail.com

³Universidade Federal do Espírito Santo/ Centro de Ciências Exatas, Naturais e da Saúde, Alto Universitário, s/n, Guararema – 29500-000 – Alegre - ES, Brasil, tcbsoares@gmail.com, francielesouza@gmail.com

Resumo

O gergelim (*Sesamum indicum* L.) é uma cultivar comercial crescente no agronegócio. O estudo da diversidade em gergelim, possibilita desenvolver cultivares com caracteres importantes para o mercado, por meio do estudo de características morfológicas e moleculares, visando o melhoramento da espécie. Assim, objetivou-se avaliar a diversidade genética de cinco genótipos de gergelim por meio da análise de polimorfismo dos marcadores moleculares SSR (*Simple Sequence Repeats*), através das reações de PCR (reação em cadeia da polimerase). Dos 55 *primers* obtidos, 41 resultaram em amplificação polimórfica e foram utilizados nas análises, os quais variaram de 1 a 5 alelos. No agrupamento dos genótipos pelo método UPGMA, observou-se a formação de 4 grupos conforme o ponto de corte utilizado. Dentre todas as análises, os genótipos com maior distância genética foram o 4 e 19. Já os genótipos mais similares foram os genótipos 3 e 4. Pode-se concluir, que os genótipos 4 e 19 apresentaram maior variabilidade genética sugerindo potencialidade no cruzamento, característica interessante melhoramento genético.

Palavras-chave: Melhoramento genético. Polimorfismo. Microssatélites.

Área do Conhecimento: Ciências Agrárias.

Introdução

O gergelim (*Sesamum indicum* L.) é uma oleaginosa pertencente ao gênero *Sesamum*, que exibe fácil cultivo, desenvolvendo em diversos solos, regiões e circunstâncias ambientais (LUCENA *et al.*, 2013). Além de, apresentar versatilidade na utilização, atuando no setor alimentício, para extração de óleo e nas indústrias farmacêutica, cosmética e oleoquímica (ARRIEL *et al.*, 2007; BELTRÃO *et al.*, 2013).

Segundo a FAOSTAT (2021) os maiores produtores mundiais nos últimos anos são o Sudão (791 mil t), Myanmar (766 mil t) e a Índia (766 mil t), enquanto a produção no Brasil atingiu 62 mil toneladas. A maior parte da produção se concentra no estado de Mato Grosso (EMBRAPA, 2021). No Brasil, na safra de 2021/2022 a produção de gergelim foi de 110,9 mil toneladas em 213,9 mil hectares plantados, gerando uma produtividade de 519 kg/ha (CONAB, 2023). Decorrente da crescente expansão do gergelim no agronegócio, é necessário por meio da medição de caracteres morfológicos, agrônômicos e moleculares estimar a diversidade genética (CRUZ; CARNEIRO, 2003).

Sendo assim, para análise da diversidade genética, os marcadores moleculares se mostram colaborativos e auxiliam na seleção de genótipos superiores, assim, estes estudos podem colaborar com a pesquisa mundialmente (POMPELLI *et al.*, 2011). Os métodos moleculares apresentam alta versatilidade em estudos moleculares e são vantajosos para a obtenção direta de informações das sequências de DNA e em relação à detecção de polimorfismo no mesmo. Existem diferentes classes de marcadores moleculares, entre eles os microssatélites, conhecidos também como SSR (*Simple*

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

Sequence Repeats). Os SSR são distribuídos por todo o genoma de maneira abundante e uniforme, eles são codominantes e multialélicos (OLIVEIRA *et al.*, 2006; OLIVEIRA e SILVA, 2008).

Portanto, estudos da diversidade genética por meio da caracterização molecular auxiliam na identificação de possíveis genótipos com caracteres de interesse que tendem a auxiliar na seleção de genótipos promissores. Neste contexto, objetivou-se avaliar a diversidade genética entre genótipos de gergelim por meio da caracterização de marcadores moleculares SSR.

Metodologia

Os genótipos de gergelim avaliados foram: TGUU1 (3), AGUU1 (4), KGAU1 (7), PGUU1 (19) e SGUU1 (20). As sementes de gergelim utilizadas nesse trabalho foram obtidas e cedidas do banco de germoplasma da empresa Sebra Agrícola - MT. As plântulas foram conduzidas em bandejas de mudas com substrato, na casa de vegetação da Universidade Federal do Espírito Santo, Campus Alegre.

As coletas de material genético para as análises moleculares e morfológicas foram realizadas a partir do segundo par de folhas de cinco indivíduos distintos e armazenadas em freezer -80°C. Para extração de DNA, foi utilizado protocolo descrito por King *et al.* (2014).

A concentração do DNA nas amostras foi verificada por espectrofotômetro Nanodrop™ 2000 (Thermo Scientific) e a integridade foi confirmada em eletroforese em gel de agarose 0,8% com 3 µL de DNA concentrado e 3 µL gelred. Foram utilizados 55 pares de *primers* microsatélites, que foram desenvolvidos dentro do programa de melhoramento da empresa Sebra agrícola. As reações de PCR foram realizadas utilizando-se: 40 ng de DNA, 0,4 µM de cada primer, 0,5% U de Invitrogen Platinum Taq DNA polimerase, 1X de tampão (10 mM de Tris-HCl pH 8,5, 50 mM KCl), 2,75mM de MgCl₂ e 0,8 mM de dNTPs, com o volume final da reação de 15 µL. As reações foram submetidas à desnaturação inicial por 4 min a 94 °C, seguido de 35 ciclos de 45 segundos a 94° C, 1 min a 56° C (variável conforme o *primer*) e 1 min a 72° C, com uma extensão final de 8 min a 72° C. Os produtos da amplificação foram separados por eletroforese em gel vertical de poliácridamida 10%, com tampão 1X TBE (Tris HCl/ácido bórico/EDTA), corados com GelRed biotium e fotografados com sistema de fotodocumentação (ChemiDocXRS + System– Bio-Rad™). O tamanho dos fragmentos amplificados foi estimado usando marcador de DNA de 100pb.

A partir dos géis de poliácridamida 10%, as imagens fotodocumentadas, foram selecionadas e os genótipos e *primers* de interesse foram analisados, calculando o número de alelos de cinco genótipos (3, 4, 7, 19 e 20) para os 55 pares de *primers* utilizados. Sendo assim, os dados moleculares foram registrados a partir das bandas detectadas entre os genótipos, onde se gerou uma matriz de valores binários, utilizando a codificação (1, 2, ..., n) estando de acordo com o número de alelos por loco. Portanto, os homozigotos foram representados por 11, 22, ..., nn, e os heterozigotos por 12, 13, 14, 23, 24, ... nn e utilizando -9 para identificar dados perdidos, ou seja, com falta de informação do indivíduo (CRUZ, 2006). Esses dados coletados foram organizados em planilhas e convertidos para os formatos exigidos para as análises do programa computacional GENES (CRUZ, 2013).

Os dados obtidos com os *primers* foram utilizados para analisar o grau de similaridade entre os genótipos avaliados. A estimativa foi realizada por meio do complemento do índice não ponderado através do programa GENES.

A matriz gerada permitiu a obtenção da frequência de dissimilaridade. Para as análises de agrupamento, foi avaliada a ligação média entre grupos (UPGMA). Para melhor visualização um dendrograma foi gerado.

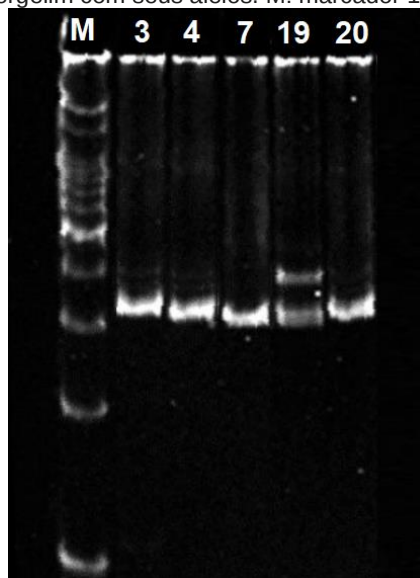
Resultados

Dentre os 55 *primers* analisados, 11 deles apresentaram o mesmo padrão de amplificação em todas as bandas, ou seja, foram identificados como monomórficos, assim não foram utilizados nas análises, uma vez que não existe variação genética entre os genótipos analisados nestas regiões. Os *primers* SIN_1006905, SIN_1005989 e SIN_102561 não amplificaram, em virtude disso também não foram utilizados nas análises. Além disso, os *primers* SIN_1015383 e SIN_100492 foram descartados das análises, uma vez que apresentaram, em 3 genótipos de 5, dados nulos (dados perdidos) o que induzia

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

ao erro na declaração de parâmetros no programa computacional GENES. Sendo assim, foram utilizados 41 *primers*, dos quais apresentaram bandas amplificadas e polimórficas, variando entre 1 e 5 o número de alelos (Figura 1).

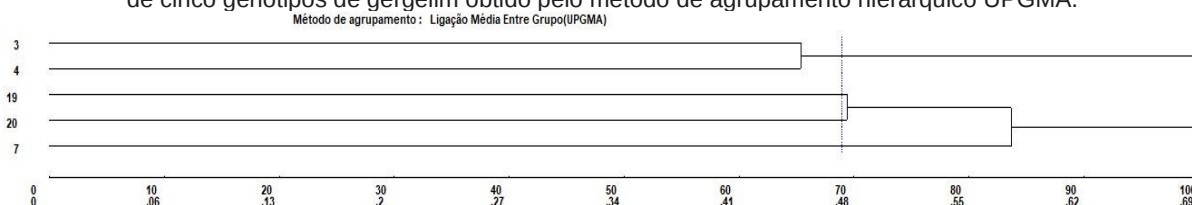
Figura 1 - Eletroforese em gel vertical de poliacrilamida 10% com a reação de amplificação do *primer* SB_SiDt_4 contendo os 5 genótipos de gergelim com seus alelos. M: marcador 100 pb; 5 amostras de DNA.



Fonte: os autores.

No dendrograma (Figura 2), observa-se a formação de 4 grupos de acordo com o ponto de corte traçado utilizando a metodologia de Mojena (1997).

Figura 2. Dendrograma da dissimilaridade genética em locos microssatélites para as características moleculares de cinco genótipos de gergelim obtido pelo método de agrupamento hierárquico UPGMA.



Fonte: os autores.

É notória a similaridade entre os genótipos 3 e 4 (0,45), se confirmando através da matriz das distâncias genéticas (Tabela 1). Entretanto, os genótipos 4 e 19 apresentam dissimilaridade (0,77), sendo os mais contrastantes.

Tabela 1 - Matriz de distâncias genéticas entre cinco genótipos de gergelim a partir da análise de 41 locos SSR.

	3	4	7	19	20
3	0	0,457143	0,541667	0,694444	0,661765
4		0	0,757143	0,779412	0,757576
7			0	0,541667	0,628571
19				0	0,485294
20					0

Fonte: os autores.

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

Discussão

Considerando a similaridade entre os genótipos 3 e 4 (0,45). Essa proximidade não é interessante para a realização de cruzamentos, uma vez que, a baixa variabilidade pode estar relacionada com a estreita base genética entre os indivíduos (MONTILLA *et al.*, 1990). Além disso, o cruzamento entre indivíduos geneticamente semelhantes aumenta o coeficiente de endogamia, podendo ocorrer maior fixação de alelos e consequentemente aumentando os homozigotos. Entretanto, os genótipos 4 e 19 apresentam dissimilaridade (0,77), sendo os mais contrastantes. A alta diversidade genética entre indivíduos é de importância em programas de melhoramento genético, contribuindo para o conhecimento científico da espécie (BARAN *et al.*, 2022).

Conclusão

Os marcadores moleculares foram eficientes para a caracterização da variabilidade genética neste estudo;

O genótipo 4 contém características que podem ser interessantes para o melhoramento, entre elas, coloração de semente e duas flores por axila, teor de óleo elevado e bom número de cápsulas por planta;

O genótipo 19 contém a semente de coloração escura, e características interessantes como 2 flores por axila e teor de óleo similar às demais sementes de coloração clara, podendo ser um genótipo em potencial;

Os genótipos contrastantes podem ser importantes para um programa de melhoramento, pois apresentam maior variabilidade genética, indicando possíveis progenitores promissores

Referências

BARAN, N. et al. Exploring Genetic Diversity and Population Structure of Turkish Black Sea Region Maize (*Zea mays* L.) Germplasm using SSR Markers. Erzincan University, **Journal of Science and Technology**, v. 15, n. 3, p. 953-963, 2022.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB. 7º Levantamento Safra 2022/23. **Boletim da safra de grãos**. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos/boletim-da-safra-de-graos>>. Acesso em: 20 de março de 2023.

CRUZ, C.D. GENES - A software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta scientiarum**. v.35, n.3, p.271-276, 2013

CRUZ, C. D. **Programa genes: análise multivariada e simulações**. Viçosa: UFV, 2006. 175P.

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

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). **Cultivo do gergelim no Brasil cresce 230% em um ano**. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/64027841/cultivo-do-gergelim-no-brasil-cresce-230-em-um-ano>. Acesso em: 25 de julho de 2023.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). **Crops and livestock products**. Disponível em: <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL/visualize>. Acesso em 19 de julho de 2023.

IPGRI e NBPGR. 2004. **Descriptors for gergelim** (*sesame sp.*). Instituto Internacional de Recursos Genéticos de Plantas, Roma, Itália; e Escritório Nacional de Recursos Genéticos de Plantas, Nova Delhi, Índia.

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

KING, Z. et al. Non-toxic and efficient DNA extractions for soybean leaf and seed chips for high-throughput and large-scale genotyping. **Biotechn. Letters**, v. 36, n. 9, p. 1875–1879, 2014.

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

MONTILLA, D.; MAZZANI, B.; CEDEÑO, T. **Mejoramiento genético del ajonjolí (*Sesamum indicum* L.) reseña y logros en Venezuela**. In: IICA. VI Curso corto tecnologia de la produccion de ajonjolí. Acarigua, Venezuela, p. 1-67, 1990.

OLIVEIRA, E. J. et al. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, n. 02, p. 294-307, 2006.

OLIVEIRA, M. S. P.; SILVA, K. J. D. Diferenciação genética entre procedências de açaizeiro por marcadores moleculares RAPD e SSR. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, n. 02, p. 438-443, 2008.

POMPELLI, M.F.; OROZCO, A.J.J.; OLIVIERA, M.T.; RODRIGUES, B.R.M.; BARBOSA, M.O.; SANTOS, M.G.; OLIVEIRA, A.F.M.; ALMEIDA-CORTEZ, J.S.; FONSECA-MORENO, L.P. Crise energética mundial e o papel do Brasil na problemática de biocombustíveis. **Agronomia Colombiana**, v.29, n.2, p. 423-433, 2011.

Agradecimentos

Agradeço ao Laboratório de Bioquímica e de Biologia molecular e a UFES pelo suporte e estrutura. A Sebra Agrícola pelo fornecimento dos materiais genéticos e suporte financeiro.