

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

VALIDAÇÃO DE MARCADORES EST-SSR EM GERGELIM (*Sesamum indicum* L.)

Paula da Silva Mendel Soares¹, Fernanda Ianuxauskas Dechechi¹, Rodrigo Monte Lorenzoni², Guilherme Ferreira Sirtoli¹, Edilson Marques Junior², Franciele Barros de Souza Sobreira³, Taís Cristina Bastos Soares³

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

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

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

Resumo

O gergelim (*Sesamum indicum* L.) apresenta uma expansão considerável em área cultivada e em produção no Brasil. A análise da variabilidade genética do gergelim é importante na orientação dos programas de melhoramento genético. Dentre as ferramentas moleculares empregadas para esse propósito, destaca-se o uso de marcadores microssatélites (SSR) encontrados em Expressed Sequence Tags (EST). Assim, objetivou-se validar *primers* de marcadores EST-SSR para gergelim em 10 genótipos. Foi utilizado o número de alelos, a heterozigosidade esperada (He) e a observada (Ho), o coeficiente de endogamia (F) e o conteúdo de informação polimórfica (PIC) para as análises. Foram avaliados 68 marcadores e a amplificação desses foi realizada por PCR. Dos 68 pares de *primers*, 63 resultaram em produtos de amplificação. As regiões analisadas variaram entre 1 a 5 alelos por loco. Os valores médios obtidos para He e Ho foram de 0,647 e 0,188; enquanto os valores médios de F e PIC para os locos a são de 0,707 e 0,592, respectivamente.

Palavras-chave: microssatélites. marcadores moleculares. diversidade genética.

Área do Conhecimento: Ciências agrárias.

Introdução

O gergelim (*Sesamum indicum* L.) é oriundo da região da Etiópia (MAZZANI, 1983), sua introdução no Brasil foi feita no século XVI pelos portugueses (QUEIROGA *et al.*, 2017) e seu mercado tem ganhado espaço no país, com aumento em área cultivada e produção, nos últimos anos (CONAB, 2022a; EMBRAPA, 2021). A produção brasileira é de 146,9 mil toneladas (CONAB, 2023).

O estudo da diversidade genética de gergelim através dos marcadores moleculares é importante, pois permite a identificação de polimorfismos (variações) no material genético dos indivíduos (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998). Eles destacam-se por sua independência de influências ambientais e do estado fisiológico do organismo em análise (LANZA *et al.*, 2000). Os SSRs exibem segregação mendeliana e são muito informativos, multialélicos e codominantes (TURCHETTO-ZOLET *et al.*, 2017). Ademais, são fáceis de automatizar as análises, possuem grande cobertura no genoma e alta reprodutibilidade (TURCHETTO-ZOLET *et al.*, 2017).

Entre os marcadores, os SSR, encontrados em *Expressed Sequence Tags* (EST) apresentam vantagens, como associação com genes de função conhecida, possuírem um alto nível de transferabilidade entre espécies próximas e baixo custo para desenvolvimento (ZHANG *et al.*, 2014).

Nesse contexto, objetivou-se validar *primers* de marcadores microssatélites contidos em (EST-SSR) para gergelim (*Sesamum indicum* L.) em 10 genótipos.

Metodologia

Foram utilizados 63 marcadores EST-SSR desenvolvidos e cedidos pela empresa Sebra Agrícola

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

para a espécie *Sesamum indicum* L., e dez genótipos, cinco comerciais (3, 4, 7, 19 e 20) e cinco não-comerciais (8, 10, 21, 22 e 24). As sementes foram colocadas em bandejas de germinação células (53 x 27 x 4,2 cm) preenchidas substrato comercial em casa de vegetação na Universidade Federal do Espírito Santo – Campus Alegre. Após a emissão do segundo par de folhas, foram coletadas para a extração do DNA.

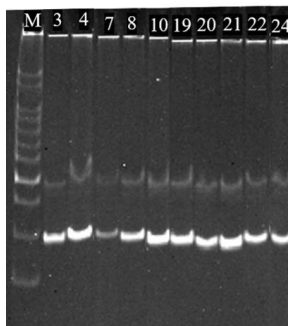
A extração do DNA foi realizada de acordo com o método descrito por King *et al.* (2014) no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular (BqMol) da Universidade Federal do Espírito Santo – Campus Alegre. A concentração do DNA nas amostras foi verificada por espectrofotômetro Nanodrop™ 2000 (Thermo Scientific) e a integridade foi confirmada em eletroforese em gel de agarose 0,8% aplicando-se 3 µL da amostra de DNA e 3 µL do reagente intercalante Gelred. As reações de PCR foram realizadas utilizando-se 40 ng de DNA, 0,4 µM de cada *primer* (F + R), 0,5 U de Taq DNA polimerase (*Invitrogen*), 1X de tampão (10 mM Tris HCl - pH 8,5, 50 mM KCl), 2,75 mM 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™).

Os dados foram tabulados a partir das bandas detectadas nos genótipos com base na leitura dos géis de poliácridamida 10%. As bandas que apresentaram mesma mobilidade foram consideradas idênticas, a presença de banda única foi considerada como alelos em homozigose. Assim, foi gerada uma matriz de valores binários, onde a codificação (1, 2, 3, n) está de acordo com o número de alelos para cada loco. Os homozigotos foram representados por 11, 22, 33, nn,; os heterozigotos por 12,13, 23, nn e o valor -9 destinado a falta de informação (dado perdido) sobre o indivíduo (CRUZ, 2006). Os dados obtidos por meio das análises dos fragmentos amplificados foram inicialmente utilizados para calcular o conteúdo de informação dos polimorfismos (PIC) como descrito por Anderson *et al.* (1993). Ademais, foram calculados o número de alelos, heterozigosidade esperada (He) e observada (Ho) e coeficiente de endogamia (F) com auxílio do aplicativo GENES (CRUZ, 2013).

Resultados

Dentre os 68 pares de *primers* testados para a amplificação por PCR destes marcadores, 63 resultaram em produtos de amplificação a partir do DNA genômico de *S. Indicum* (Figura 1). Os pares de *primers* SIN_1006905, SIN_1005989, HS1036, SIN_1025617 e SIN_1025734 não amplificaram nenhum fragmento de DNA.

Figura 1. Eletroforese em gel vertical de poliácridamida 10% com a reação de amplificação do par de *primer* SiCL1 contendo os 10 genótipos de gergelim. M: marcador 100 pb; 10 amostras de DNA.



Fonte: Os autores.

Entre *primers* testados, o protocolo de amplificação descrito demonstrou eficiência para 63 *primers* (Tabela 1), os outros 5 não amplificaram ou exibiram amplificações muito inespecíficas. Com base nas recomendações de temperatura de anelamento feita pelo fabricante dos *primers* foi possível padronizar a temperatura para a maioria dos *primers* em 56 °C. Após a primeira reação de amplificação, os *primers*

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

que não obtiveram amplificação foram selecionados para uma segunda tentativa, entretanto os SIN_1006905, SIN_1005989, HS1036, SIN_1025617 e SIN_1025734 continuaram não apresentando resultados.

Os pares de *primers* SIN_1007671, SIN_1001921, SIN_1006338, SIN_1014994, SIN_1010473, SIN_1010970, SIN_1013020, SIN_1010870 e SIN_1021891 resultaram na amplificação de regiões monomórficas como resultado de alelos em homozigose e, deste modo, não é verificada nenhuma variação genética entre os genótipos analisados nestas regiões. Por outro lado, os pares de *primers* SIN_1007062 e M58311 apresentaram maior número de alelos por loco e, assim, são mais polimórficos.

Os *primers* exibiram número de alelos variando de 1 a 5 alelos por loco, heterozigosidade média esperada e observada nos 63 locos foi de 0,647 e 0,188, com maior H_o de 0,333, enquanto a menor foi 0,091 e a média do coeficiente de endogamia (F) foi 0,707.

Os valores de PIC neste estudo variaram entre 0,406 e 0,712, com valor médio de 0,592. Entre os 63 EST-SSRs validados para o gergelim, 56 foram classificados como marcadores muito informativos ($PIC > 0,5$).

Tabela 1. Número de alelos, heterozigosidade esperada (H_e) e observada (H_o), coeficiente de endogamia (F) e conteúdo de informação polimórfica (PIC) de 63 locos avaliados em 10 genótipos de *S. indicum*

Loco	Alelo	H_e	H_o	F	PIC
SIN_1024652	3	0,651	0,111	0,829	0,597
SIN_1007671	1	0,465	0,125	0,731	0,406
SIN_1008977	3	0,643	0,182	0,717	0,575
SIN_1022133	3	0,676	0,091	0,865	0,635
SIN_1001921	1	0,684	0,091	0,867	0,630
SiCL1	2	0,648	0,200	0,691	0,591
SIN_1006338	1	0,672	0,273	0,594	0,629
SIN_1014994	1	0,548	0,273	0,502	0,475
SIN_1011197	2	0,721	0,182	0,748	0,669
SIN_1015742	3	0,655	0,182	0,722	0,592
EcMs	2	0,698	0,100	0,857	0,647
SIN_1010473	1	0,643	0,182	0,717	0,605
SIN_1015527	3	0,565	0,111	0,803	0,518
SIN_1017003	3	0,668	0,100	0,850	0,608
SIN_1021838	2	0,634	0,182	0,713	0,592
SIN_1022538	3	0,692	0,273	0,606	0,646
SIN_1017183	2	0,678	0,300	0,557	0,616
SIN_1003263	2	0,658	0,300	0,544	0,592
SIN_1015387	4	0,676	0,111	0,836	0,618
SIN_1026440	3	0,728	0,100	0,863	0,685
SIN_1010970	1	0,725	0,273	0,624	0,679
SIN_1013020	1	0,738	0,273	0,630	0,692
SIN_1005078	4	0,673	0,200	0,703	0,614
SIN_1007062	5	0,668	0,100	0,850	0,608
SSI429-1	3	0,513	0,200	0,610	0,457
SIN_1015383	2	0,643	0,091	0,859	0,584
SIN_1012084	3	0,653	0,200	0,694	0,588

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

M58311	5	0,515	0,222	0,569	0,479
M4E17-7	4	0,618	0,091	0,853	0,564
HS205	3	0,513	0,200	0,610	0,457
HS1956	4	0,593	0,300	0,494	0,509
HS1638	2	0,588	0,200	0,660	0,506
Y2129	2	0,692	0,182	0,737	0,646
SIN_1003248	3	0,618	0,091	0,853	0,564
SIN_1009923	4	0,682	0,333	0,511	0,645
SIN_1007213	3	0,753	0,200	0,734	0,712
M9E8-2	4	0,683	0,300	0,560	0,631
M15E7-2	4	0,628	0,100	0,841	0,556
SIN_1004921	3	0,658	0,200	0,696	0,592
SIN_1018135	4	0,546	0,222	0,593	0,486
SIN_1014512	2	0,643	0,273	0,576	0,575
SIN_1021799	3	0,670	0,222	0,668	0,626
SIN_1015742	3	0,676	0,333	0,507	0,618
SIN_1016441	2	0,602	0,333	0,446	0,545
SIN_1004125	2	0,688	0,100	0,855	0,628
M19E17-3	4	0,618	0,200	0,676	0,549
M13E11-2	4	0,701	0,111	0,841	0,656
SIN_1017074	2	0,627	0,222	0,645	0,585
SIN_1003215	4	0,606	0,125	0,794	0,554
SIN_1008249	4	0,633	0,200	0,684	0,564
SIN_1013971	3	0,648	0,200	0,691	0,594
SIN_1012023	2	0,543	0,091	0,833	0,440
SIN_1005985	4	0,668	0,100	0,850	0,608
SIN_1016759	3	0,684	0,091	0,867	0,623
SIN_1019747	2	0,676	0,222	0,671	0,622
SIN_1010870	1	0,668	0,200	0,700	0,624
SIN_1015471	2	0,684	0,091	0,867	0,623
SIN_1017036	3	0,731	0,125	0,829	0,688
SIN_1021891	1	0,713	0,300	0,579	0,662
SIN_1002815	2	0,670	0,333	0,502	0,626
SIN_1018247	4	0,663	0,182	0,726	0,616
SIN_1018326	3	0,618	0,182	0,706	0,564
SIN_1001964	4	0,723	0,200	0,723	0,676
Média	–	0,647	0,188	0,707	0,592

Fonte: Os autores.

Discussão

Com os resultados obtidos foi possível verificar que os *primers* apresentaram eficiência em separar os alelos demonstrando a diferença entre os genótipos.

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

A amplificação de um *primer* pode ser afetada por diferentes fatores que interferem no seu anelamento e sua extensão. Com isso, alterações na síntese dos *primers*, condições de amplificação utilizadas, diferenças dos reagentes e manejo dos mesmos por parte do operador, podem interferir no sucesso do seu uso (LORENZ, 2011). Além disso, a falha na amplificação pode ser devida à divergência nas sequências que flanqueiam os SSRs criando, assim, alelos nulos (SMULDERS *et al.*, 1997).

A He foi maior que a Ho para todos os locos estudados. A Ho menor que a He pode ser um indicativo de excesso de homozigotos e, conseqüentemente, um déficit de heterozigotos (BELALIA *et al.*, 2019).

Os resultados indicam um nível significativo de endogamia nos genótipos analisados, sugerindo uma maior incidência de cruzamentos entre indivíduos geneticamente relacionados em relação à média da população. Além disso, valores de Ho menores podem indicar maiores níveis de fixação de alelos, observados nos maiores valores de F (ROJAS, 2017). Wu *et al.* (2014) afirmam que cultivares melhoradas de gergelim tem base genética estreita em relação as variedades crioulas.

O conteúdo de informação polimórfica (PIC) corresponde a capacidade de detectar o polimorfismo entre os indivíduos de uma população e é um indicativo de qualidade do marcador em estudos genéticos (SERROTE, 2019). Os valores de PIC para marcadores codominantes variam de 0 (monomórfico) a 1 (altamente informativo, com vários alelos de igual frequência) (SERROTE, 2019). Um marcador que revela diferentes alelos, sendo um deles encontrado em frequência muito alta, tem uma capacidade discriminatória menor do que outro que detecte a mesma quantidade de alelos com frequências similares (SMITH *et al.*, 1997). Segundo Botstein *et al.* (1980), os marcadores podem ser classificados em função da quantidade de informação em: locos muito informativos ($PIC > 0,50$), medianamente informativos ($0,25 < PIC < 0,50$) e pouco informativos ($PIC < 0,25$).

Os valores de PIC neste estudo sugerem que os marcadores são resolutivos e podem ser usados em estudos de diversidade genética de gergelim.

Conclusão

Os marcadores EST-SSR para gergelim avaliados neste estudo foram validados com sucesso e se mostraram eficientes em estudos de diversidade genética da espécie.

Os locos estudados podem ser classificados como medianamente informativos e muito informativos.

Os dados aqui obtidos são úteis para novos estudos visando o *screening* molecular de genótipos superiores.

Referências

ANDERSON J. A.; CHURCHILL G. A.; AUTRIQUE J. E.; TANKSLEY S. D.; SORRELLS, M. E. Optimizing parental selection for genetic linkage maps. **Genome** v. 36, p.181–186, 1993.

BELALIA, N. *et al.* Analysis of genetic diversity and population structure in Saharan maize (*Zea mays* L.) populations using phenotypic traits and SSR markers. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 66, n. 1, p. 243-257, 2019.

BOTSTEIN, D.; WHITE, R. L.; SKOLNICK, H.; DAVIS, R. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **American Journal of Human Genetics**, v.32, p.314_331, 1980.

CONAB. Acompanhamento da safra brasileira de grãos, safra 2022/23. **Companhia Nacional de Abastecimento**, v. 10, n. 7, sétimo levantamento, 2023.

CONAB. Acompanhamento da safra brasileira de grãos. **Companhia Nacional de Abastecimento**, v. 10, n. 2, p. 1–84, 2022a.

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

CRUZ, C.D.;REGAZZI, A.J.; CARNEIRO, P.C.S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. 3 ed. Viçosa: UFV, v.1, 2004, 480p.

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

EMBRAPA. **Cultivo do gergelim no Brasil cresce 230% em um ano - Portal Embrapa. Embrapa Agrossilvipastoril**, 2021. Disponível em: < <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/64027841/cultivo-do-gergelim-no-brasil-cresce-230-em-um-ano>>. Acesso em: 13 abr. 2023.

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

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.

LANZA, M. A.; GUIMARÃES, C. T.; SCHUSTER, I. **Aplicação de marcadores moleculares no melhoramento genético**. 2000.

LORENZ, T. C. Polymerase chain reaction: basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. **Journal of visualized experiments: JoVE**, n. 63, p. 1-15, 2011.

MAZZANI, B. Cultivo y mejoramiento de plantas oleaginosas. **Caracas**, p. 169–226, 1983.

QUEIROGA, V. DE P. *et al.* **GERGELIM - A Importância da cultura**. Teresina, 2017. Disponível em: <www.embrapa.br/fale-conosco/sac>. Acesso em: 13 abr. 2023.

ROJAS, B. B. **Diversidade e estrutura genética de variedades crioulas de milho pipoca conservadas por agricultores familiares dos municípios de Anchieta e Guaraciaba no extremo oeste de Santa Catarina**. Dissertação - Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal de Santa Catarina, 2017.

SERROTE, C. M. L.; REINIGER, L. R. S.; SILVA, K. B.; RABAIOLLI, S. M. S.; STEFANEL, C. M. Determining the Polymorphism Information Content of a Molecular Marker. **Gene**, 2019.

SMITH, J.S.C.; CHIN, E.C.L. SHU, H.; SMITH, O.S.; WALL, S.J.; SENIOR, M.L.; MITCHELL, S.E.; KRESOVICH, S.; ZIEGLE, J. An evaluation of the utility of SSR loci as molecular markers in maize (*Zea mays* L.) - Comparisons with data from RFLPs and pedigree. **Theoretical and Applied Genetics** 95: 163-173.1997.

SMULDERS, M. J. M.; BREDEMEIJER, G.; RUS-KORTEKAAS, W.; ARENS, P.; VOSMAN, B. Use of short microsatellites from database sequence to generate polymorphism among *Lycopersicon esculentum* cultivars and accessions of other *Lycopersicon* species. **Theor Appl Genet** 97: 264–272. 1987.

TENYANG, N.; PONKA, R.; TIENCHEU, B.; DJIKENG, F. T.; AZMEERA, T.; KARUNA, M. S. L., *et al.* Effects of boiling and roasting on proximate composition, lipid oxidation, fatty acid profile and mineral content of two sesame varieties commercialized and consumed in Far-North Region of Cameroon. **Food Chemistry**, v. 221, p. 1308–1316, 2017.

TURCHETTO-ZOLET, A. C.; TURCHETTO, C.; GUZMAN, F.; SILVA-ARIAS, G. A.; SPERB-LUDWIG, F.; VETO, N. M. Polimorfismo de Nucleotídeo único (SNP): metodologias de identificação, análise e aplicações. **Marcadores Moleculares na Era Genômica: Metodologias e Aplicações**. Sociedade ed., p.132–166, 2017. São Paulo.

WU, K; YANG, M.; LIU, H; TAO, Y.; MEI, J.; ZHAO, Y. Genetic analysis and molecular characterization of Chinese sesame (*Sesamum indicum* L.) cultivars using Insertion-Deletion (InDel) and Simple Sequence Repeat (SSR) markers. **BMC Genetics**, v. 11, n. 35, 2014.

ZHANG, M., MAO, W., ZHANG, G., WU, F. Development and Characterization of Polymorphic EST-SSR and Genomic SSR Markers for Tibetan Annual Wild Barley. *Plos One*, China, v. 9, 2014.

Agradecimentos

À sebra Agrícola pelo fornecimento dos materiais genéticos e suporte financeiro para desenvolvimento das análises. À Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) por possibilitar a realização dessa pesquisa.