



CARACTERIZAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DA COLEÇÃO DE GERGELIM DO IAC

Erick Mutti Tilieri¹; Amadeu Regitano Neto², Brenda G. Díaz Hernández³; Carlos A. Colombo²

Nº 14106

RESUMO - O gergelim é uma planta herbácea originária do Oriente. No Brasil, seu cultivo teve início na década de 50 pelo Instituto Agrônomo de Campinas. Possui elevado teor de óleo de excelente qualidade em suas sementes que pode ser usado para produção de alimentos, cosméticos e fitoterápicos. A sua adaptação ao clima e solo brasileiros representa uma alternativa econômica viável ao pequeno agricultor e na fabricação de produtos derivados do seu óleo. O melhoramento genético da espécie visa obter maior capacidade produtiva, alto teor de óleo e porte da planta adequado à colheita manual ou mecanizada. Uma vez que combinação de genótipos geneticamente divergentes representa importante estratégia no melhoramento genético, ressalta-se a importância da caracterização da diversidade genética existente em coleções de trabalho, tanto para serem utilizadas no programa de melhoramento como também para a sua conservação em bancos de germoplasma. O presente trabalho teve por objetivo caracterizar a diversidade genética dos acessos de gergelim do IAC por meio de descritores botânicos e marcadores moleculares. A similaridade genética média encontrada entre os acessos avaliados foi de 0,51 e 0,41 para dados morfo-agronômicos e moleculares, respectivamente, sendo que os acessos mais divergentes entre si apresentaram apenas 0,20% de identidade genética, para ambos os conjuntos de dados. Ambos os conjuntos de dados, botânicos e moleculares, foram eficientes e quantificar a diversidade do BAG gergelim, sendo os botânicos mais informativos para estruturar a diversidade genética dos acessos.

Palavras-chaves: *Sesamum indicum*; melhoramento genético; oleaginosa; RAPD; ISSR; agricultura familiar.

1 Autor, Bolsista CNPq (PIBIC): Graduação em Bacharelado em Biotecnologia, UFSCar, Araras-SP; erick.mutti@hotmail.com

2 Pesquisador, Centro de Grãos e Fibras, IAC

3 Pesquisadora, C. E. Cotaxtla. INIFAP, Mexico.

4 Orientador: Pesquisador, Centro de Recursos Genéticos, IAC, iac.colombo@gmail.com



ABSTRACT- Sesame is an herbaceous plant from the East. In Brazil, its cultivation began in the 50s by the Campinas Agronomic Institute, in São Paulo. It has high content of excellent quality oil in its seeds that can be used for food production, cosmetics and herbal medicines. Their adaptation to the Brazilian climate and soil represents a viable economic alternative to small farms and manufacture of products derived from its oil. The genetic improvement of the species seeks greater productive capacity, high oil content and appropriate size of the plant to manual or mechanical harvesting. Since combination of genetically divergent genotypes is important in genetic improvement strategies, the characterization of genetic diversity in existing work collections is noteworthy, for both use in the genetic improvement program as well as for their conservation in genebanks. The present work aims to characterize the genetic diversity of sesame accessions IAC through morpho-agronomic and molecular markers. The average genetic similarity found between accessions was 0.51 and 0.41 for morpho-agronomic and molecular data, respectively, with the most divergent accessions showing only 0.20% of genetic identity among themselves, for both sets of data. Both data sets, botanical and molecular, were effective in quantifying the diversity of the ABG sesame. The botanical data are more informative than the molecular data to structure the genetic diversity of accessions.

Key-words: *Sesamum indicum*; plant breeding; oleaginous; RAPD; ISSR; small farmer

1 INTRODUÇÃO

O gergelim (*Sesamum indicum* L. - Pedaliaceae) é uma oleaginosa arbustiva originária dos continentes africano e asiático cujas sementes contêm cerca de 50% de óleo de excelente qualidade, semelhante ao óleo de oliva (Weiss, 1983), rico em ácidos graxos insaturados, como oleico e linoleico, além de apresentar vários constituintes secundários fundamentais na definição de suas qualidades.

Apesar da importância, o Brasil nunca conseguiu estabelecer o seu cultivo de forma competitiva e as tentativas de exploração racional tiveram início em 1936 no Instituto Agrônomo de Campinas, com material proveniente da Bulgária e da Índia que deu início a coleção de germoplasma do Instituto. Assim, não existe nenhum cultivar brasileira.

A baixa produtividade do gergelim pode ser em parte atribuída ao plantio predominante de variedades convencionais (Hamid et al., 2003). Os genótipos de gergelim mantidos em coleção podem ser usados de forma direta, como variedades comerciais, ou empregados nos programas de melhoramento, visando à criação de novas cultivares. Para tanto, esses materiais necessitam



8º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2014 12 a 14 de agosto de 2014 – Campinas, São Paulo

estar caracterizados e avaliados para permitir um aproveitamento melhor da variabilidade genética, de acordo com a sua finalidade (Furat & Uzun, 2010). O conhecimento da diversidade, baseado em informações sem influência ambiental, como as geradas pelos marcadores moleculares, além de direcionar as estratégias de cruzamentos específicos, maximizam os ganhos genéticos nos ciclos de seleção, além de otimizar procedimentos para fins de conservação de recursos genéticos (DIAS, 1998). Dados de caracteres morfo-agronômicos assim como de marcadores moleculares são normalmente analisados por meio de métodos de análise multivariada, como os de agrupamento (hierarquização e otimização) e os de ordenação (componentes principais e coordenadas principais). A análise de agrupamento procura discriminar geneticamente os indivíduos, e permite separá-los em grupos pela análise de um conjunto de características inerentes a cada indivíduo, agrupando-os por algum critério de classificação, de forma que exista homogeneidade dentro do grupo e heterogeneidade entre grupos (Cruz & Carneiro, 2003).

Esse estudo tem como proposta caracterizar a diversidade genética dos acessos de gergelim do IAC para fins de melhoramento genético e conservação da espécie por meio de marcadores morfo-agronômicos e moleculares, quantificar e estruturar a diversidade genética do BAG gergelim do IAC e estabelecer o grau de divergência genética entre acessos, procurando associações de ambos conjunto de dados, morfo-agronômicos e moleculares.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O material de estudo foi composto por 56 acessos do BAG-Gergelim do IAC correspondendo a tipos locais, variedades obtidas e cultivares exóticas introduzidas. Os acessos foram semeados em condições de campo na Fazenda Santa Elisa do IAC (CEC) e conduzidos em parcelas únicas, sem repetição. Cada parcela correspondia a uma fileira de 5m de comprimento e o espaçamento de 1,0m entre fileiras, perfazendo cerca de 50 plantas por parcela. Nessa fase do cultivo foram anotados os dados morfológicos referentes à coloração da semente e da folha, presença ou ausência de ramificação, forma e tamanho da folha, tipo de capsula, forma do caule e deiscência.

Para o estudo molecular da diversidade entre acessos, duas folhas de dez plantas de cada parcela foram reunidas em uma mesma amostra, formando um *bulk* para extração de DNA, sendo adotado o protocolo do CTAB descrito por Doyle & Doyle (1990). O DNA foi extraído de 200 mg de tecido fresco obtido com auxílio de um perfurador e macerados na presença de N₂ líquido.

Os oligonucleotídeos iniciadores da reação de PCR (primers) para os RAPDs (OPG-16, OPAZ-20, OPC-07, OPG-04) foram selecionados de um conjunto de 28. As reações de PCR foram



8º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2014 12 a 14 de agosto de 2014 – Campinas, São Paulo

conduzidas em volume final de 20 μ L contendo 6mM de tampão Tris-HCl pH 8,8; 0,2 mM de DNTPs; 0,4 μ M de indicadores; Taq DNA polimerase 1,0 U por amostra; 40 ng de DNA e 2,5 mM de $MgCl_2$. A amplificação foi realizada em um termociclador PTC-200, programado para um ciclo de três minutos a 94° C, 45 ciclos de um minuto a 93° C, um minuto a 35° C, dois minutos a 72° C e um ciclo final de cinco minutos a 72°C. Posteriormente, às amostras amplificadas foram adicionados 2 μ L de corante GelRed e a solução pipetada em gel de agarose 1,5% para eletroforese (3,5V/cm). O tamanho das bandas geradas foi estimado com inclusão de DNA de tamanho molecular conhecido “ladder mix”, que apresenta bandas que variam de 100 a 3000pb.

Para seleção dos primers ISSR foram realizados testes para determinar a temperatura ideal de anelamento de cada indicador disponível para o estudo, seguindo as mesmas concentrações de reagentes utilizadas nas reações RAPD. A temperatura de anelamento que produziu melhores produtos de amplificação e adotada para os quatro iniciadores escolhidos foi de 50,7°C. As amplificações foram realizadas em termociclador PTC-200, programado para um ciclo de quatro minutos a 94° C, 40 ciclos de um minuto a 94° C, um minuto a um gradiente de 45 a 60°C, um minuto e meio a 72° C e um ciclo final de quatro minutos a 72°C. O produto das amplificações foi visualizado em gel de agarose 2%, coradas com 2 μ L de solução corante GelRed e eletroforese a 3,5V/cm.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados morfo-agronômicos foram inicialmente transformados na forma de presença ou ausência das classes de cada característica avaliada, desta forma obtendo-se uma matriz de dados 0 e 1 (disjuntivo completo).

Para os marcadores moleculares foram adotados 4 iniciadores de cada marcador (RAPD e ISSR) para o estudo. O número total de bandas geradas foi de 58 e 60, com média de 14,5 e 16 bandas por iniciador, respectivamente. O marcador RAPD revelou maior polimorfismo que o marcador ISSR, com 71% de suas bandas apresentando polimorfismo, contra 51,5% dos ISSR (Tabela 1).

Tabela 1. Relação de iniciadores RAPD e ISSR selecionados para genotipagem de acessos de gergelim, número total de bandas produzidas e porcentagem de bandas polimórficas.

Marcador	Iniciador	nº de bandas	% de bandas polimórficas
RAPD	OPG-16	11	55
	OPAZ-20	15	87
	OPC-07	18	78



8º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2014
12 a 14 de agosto de 2014 – Campinas, São Paulo

	OPG-04	14	64
	Total/média	58/14,5	71%
ISSR	02	15	67
	03	11	36
	05	18	28
	06	16	75
	Total/Média	60/15	51,5%

Cada amostra ou acesso analisado pela eletroforese em gel de agarose teve suas bandas como presentes (1) ou ausentes (0), assim como os dados de características morfo-agronômicas, representados em uma matriz de dupla entrada (indivíduos x bandas). A partir desta matriz foi obtido o coeficiente de similaridade genética de Jaccard entre todos os acessos dois a dois comparados (S_{xy}), cuja variação vai de 0 (total desigualdade) a 1 (total identidade):

$$S_{xy} = \frac{N_{xy}}{N_x + N_y}$$

Sendo, N_x o total de bandas presentes em x , N_y o total de bandas presentes em y e N_{xy} o número de bandas compartilhadas pelos indivíduos x e y .

A partir dos dados da matriz de similaridade dos dados botânicos e moleculares foram obtidos os respectivos dendrogramas pelo método de agregação UPGMA (hierarquia pela ligação média entre clusters), conforme as figuras 1 e 2, respectivamente.

O dendrograma com dados morfo-agronômicos permitiu separar os acessos em dois grupos principais, A e B. O grupo A pode ser subdividido em dois subgrupos: o subgrupo A1, contendo os acessos de número 1, 29 e 59; e o subgrupo A2, contendo os acessos de número 7, 68, 108, 70, 65, 77, 25, 9, 40, 30, 33, 110, 36, 46, 37, 23, 76, 51, 6, 38, 34, 35, 63, 73, 31, 54 e 55. No grupo B pode ser identificados outros dois subgrupos: B1, contendo os acessos de número 42, 26, 47, 28, 15, 32, 24, 8, 16, 2, 11, 39, 41, 13, 5, 3, 67, 12, 27 e 43; e o subgrupo B2 contendo os acessos de número 4, 10, 17, 74, 14 e 58. As características predominantes dos acessos do grupo A são: semente branca e combinações, presença de ramificações, presença de folhas verdes, presença de 3 frutos por axila, folhas do tipo estreita média e cápsula do tipo elíptica. Comparando as principais características nos subgrupos em A, os acessos do subgrupo A1 diferem-se pela presença de semente preta e cinzas, folhas do tipo estritamente grande, presença tanto de um quanto três frutos por axila e cápsulas tanto do tipo elíptica quanto oblonga, enquanto que no subgrupo A2 as sementes apresentam coloração branca e combinações, folhas do tipo estreita média, três frutos com axila e capsulas do tipo elíptica.



Comparando as principais características nos subgrupos em B. Os acessos do grupo B1 diferem-se pela presença de folhas verdes do tipo estreita grande, enquanto que no subgrupo B2 as folhas apresentam folhas verde escuras do tipo larga média.

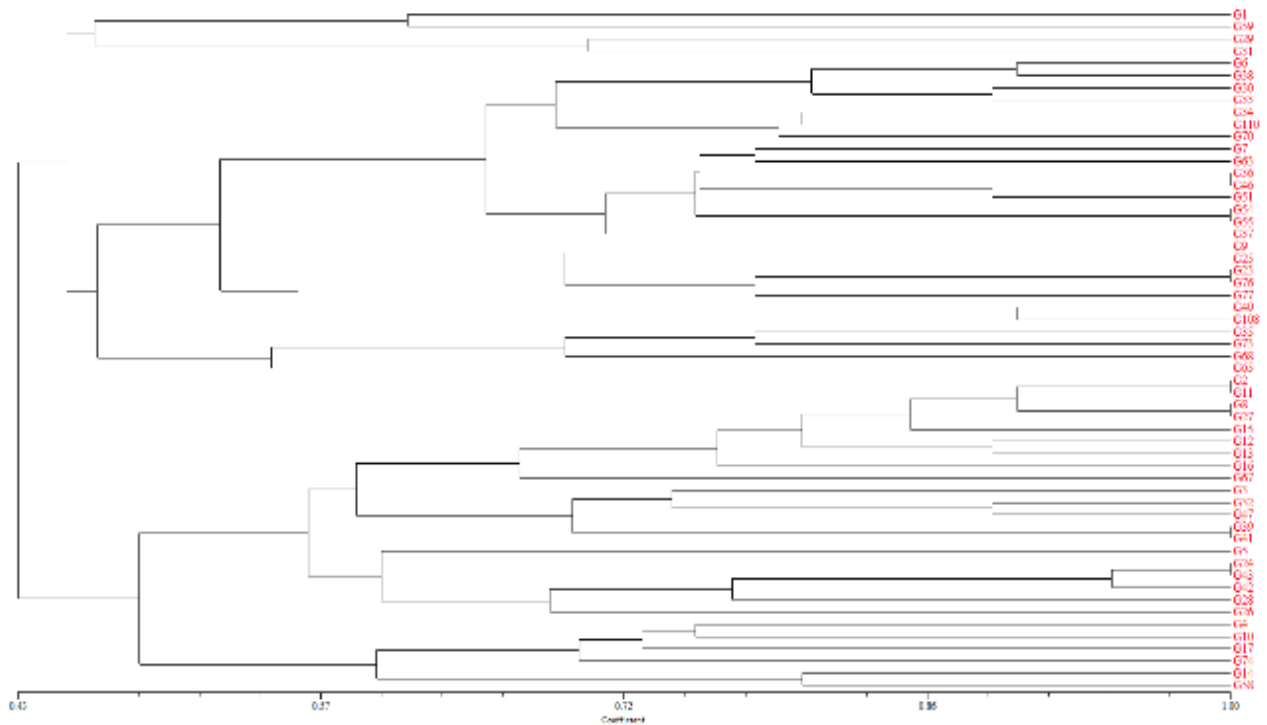


Figura 1. Dendrograma (UPGMA) obtido a partir do índice de similaridade (Jaccard) calculado para 56 acessos de gergelim diferenciados com dados de descritores botânicos.

A partir da análise do dendogramas com dados moleculares, os acessos foram divididos em quatro grupos principais: o grupo A, composto pelos acessos de número 1, 4, 5, 29, 32, 2, 3, 13, 33, 8, 9, 27, 28, 16, 23, 24, 25, 14, 77, 6, 17, 10, 15, 31, 30 e 73; o grupo B, composto pelos acessos de número 38, 37, 42, 43, 46, 54, 39, 55, 51, 74, 68, 35, 63, 41, 65, 67, 70, 76, 36, 40, 59, 108, 110, 34, 37 e 58; o grupo C, composto pelos acesso de número 12; o grupo D composto pelos acessos de número 7, 26 e 11. As características predominantes dos acessos do grupo A são: semente branca e combinações, ausência de ramificações, presença de folhas verdes, presença 3 frutos por axila, folha estreita média e cápsula do tipo elíptica. As características predominantes dos acessos do grupo B são: semente branca, presença de ramificações, presença de folhas verdes, presença de três frutos por axila, folha do tipo estreita média e cápsula do tipo elíptica. As características predominantes dos acessos do grupo C são: semente castanha escura, ausência de



ramificações, presença de folhas verdes, presença de três frutos por axila, folha do tipo estreita grande e cápsula do tipo elíptica. As características predominantes dos acessos do grupo D são: semente bege e combinações, ausência de ramificações, presença de folhas verdes, presença de três frutos, folha do tipo estreita média e cápsula do tipo elíptica.

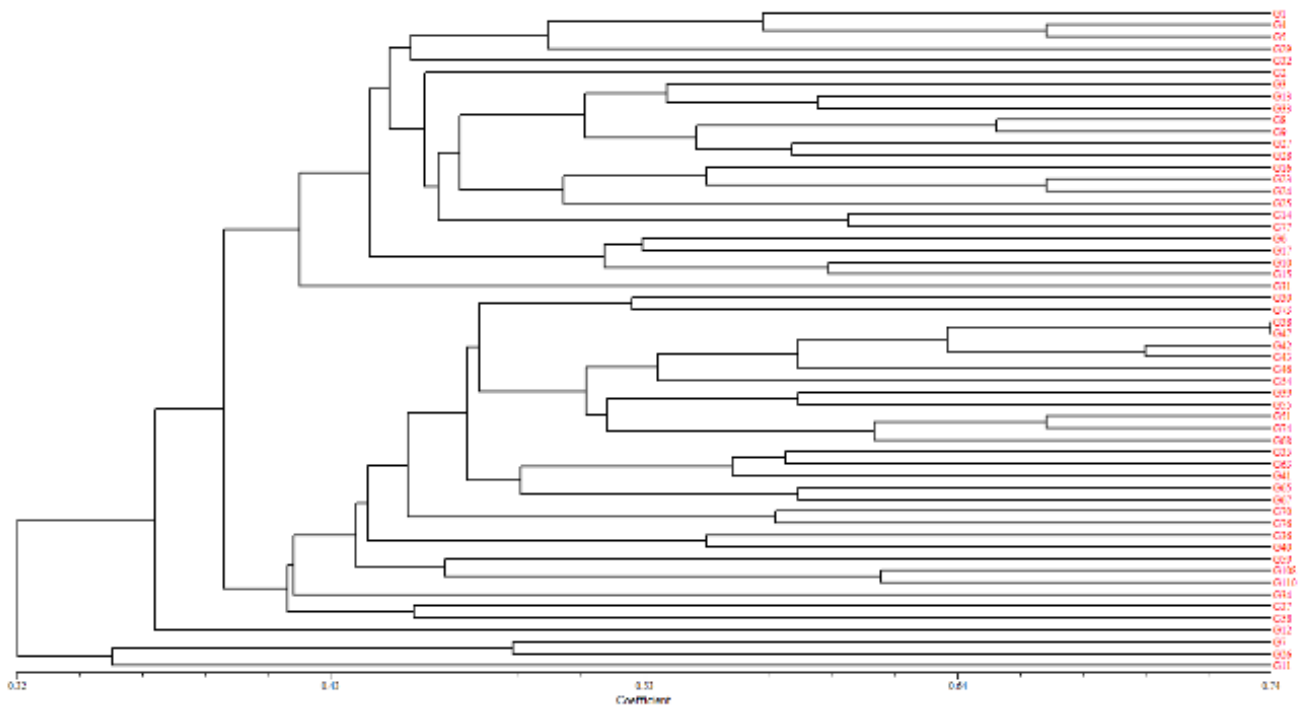


Figura 2. Dendrograma (UPGMA) obtido a partir do índice de similaridade (Jaccard) calculado para 56 acessos de gergelim diferenciados com dados de marcadores moleculares RAPD e ISSR.

A amplificação com os quatro indicadores RAPD selecionados obteve uma média de 70,8% de bandas polimórficas em 56 acessos de gergelim. A frequência de bandas polimórficas se mostrou próxima da obtida por AKBAR et al.(2011) em 20 acessos de gergelim, ressaltando que os indicadores RAPD utilizados e o número de acessos analisados foram diferentes dos utilizados no trabalho citado. A frequência de bandas polimórficas amplificadas no presente trabalho foi superior a frequência obtida por Ariel et al.(2006) em 35 acessos de gergelim, ressaltando que, no trabalho citado, os indicadores RAPD utilizados e o número de acessos são diferentes dos analisados neste presente trabalho. A amplificação com quatro indicadores ISSR obteve uma frequência média de 51,43% de bandas polimórficas em 56 acessos de gergelim.



4 CONCLUSÃO

A diversidade encontrada nos acessos de gergelim do IAC é relevante e semelhante àquela revelada por AKBAR et al.(2011) e superior à encontrada por ARIEL et al. (2006). Os dados botânicos são mais eficientes para estruturar a diversidade genética quando comparados aos dados moleculares, sendo que a coloração das sementes, ramificações e forma e tamanho de folhas foram as características com maior divergência entre os acessos. No entanto, ambos os conjuntos de dados são informativos e eficientes para estabelecimento de relações de parentesco genético entre diferentes acessos de gergelim, tanto para conservação como para direcionamento de cruzamentos em gergelim. Porém, um maior número tanto de descritores botânicos como marcadores moleculares são necessários para mais bem compreender a diversidade genética do germoplasma de gergelim do IAC.

5 AGRADECIMENTOS

Ao CNPQ pelas bolsas PIBIC e de produtividade de pesquisa concedidas a E.M.T. e C.A.C., respectivamente.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKBAR, F.; RABBANI, A.; MASOOD,S.;SHINWARI, Z.K. 2011. Genetic diversity of sesame(*Sesamum indicum* L.) germplasm from Pakistan using RAPD markers. *Pakistan Journal of botany*. Paquistão, 43: 2153-2160.
- ARRIEL, N.H.C.; VIEIRA, D.J.; FIRMINO, P.T. 1998. Situação atual e perspectivas da cultura do gergelim no Brasil. *Campina Grande: EMBRAPA-CNPA*.
- ARRIEL, N.H.C.; FREIRE, E.C.; ANDRADE, F.P. Melhoramento genético. In: BELTRÃO, N.E. de M.; VIEIRA, D.J. (Ed.). *O agronegócio do gergelim no Brasil*. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica; Campina Grande: Embrapa Algodão, 2001. p.247-284.
- ARRIEL, N.H.C. et al. 2006. Técnicas multivariadas na determinação da diversidade genética em gergelim usando marcadores RAPD. *Pesq. Agropec. Bras.* 41: 801-809.
- BELTRÃO, N. E. M.; VIEIRA, D. J. *O agronegócio do gergelim no Brasil*. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2001. p.121-160. 348p.
- BERED, F.; BARBOSA NETO, J.F.; ROCHA, B.M. da; CARVALHO, F.I.F. de. 2002. Genetic variability in wheat (*Triticum aestivum* L.) germplasm revealed by RAPD markers. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 2: 495-502.
- BHAT K.V., BABREKAR P.P. and LAKHANPAUL S. 1999. Study of genetic diversity in Indian and exotics sesame (*Sesamum indicum* L.) germplasm using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Euphytica* 110: 21–33.
- DOYLE, J.J.; DOYLE J.L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12: 13-15.
- FURAT, S.;UZUN, B.. 2010. The use of agro-morphological characters for the assessment of genetic diversity in sesame (*Sesamum indicum* L.). *Plant Omics Journal*, 3: 85-91.



8º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2014
12 a 14 de agosto de 2014 – Campinas, São Paulo

ROCHA, G.M.G. Caracterização de genótipos do gergelim utilizando RAPD e microssatélite. Universidade Estadual da Paraíba. Campina Grande, PB, 2012.