



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAIBA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA  
CURSO DE LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**GEISENILMA MARIA GONÇALVES DA ROCHA**

**CARACTERIZAÇÃO DE GENÓTIPOS DO GERGELIM UTILIZANDO  
RAPD E MICROSSATÉLITE**

CAMPINA GRANDE – PB  
2012

**GEISENILMA MARIA GONÇALVES DA ROCHA**

**CARACTERIZAÇÃO DE GENÓTIPOS DO GERGELIM UTILIZANDO  
RAPD E MICROSSATÉLITE**

Trabalho de Conclusão de Curso, apresentado ao curso de Licenciatura Plena em Ciências Biológicas da Universidade Estadual da Paraíba, em cumprimento às exigências para obtenção do grau de Licenciado em Ciências Biológicas.

**Orientador: D.Sc. Nair Helena Castro Arriel**

**Co-orientador: Prof. M.Sc. Walter Fabrício Silva Martins**

CAMPINA GRANDE – PB  
2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL – UEPB

R672c Rocha, Geisenilma Maria Gonçalves da.  
Caracterização de genótipos de gergelim utilizando RAPD e microssatélte [manuscrito] / Geisenilma Maria Gonçalves da Rocha. – 2012.  
42 f. : il. color.

Digitado.  
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2012.  
“Orientação: Profa. Dra. Nair Helena Castro Arriel, Embrapa Algodão”.

1. *Sesamum indicum* L. 2. Genética agrícola. 3. Variabilidade genética. I. Título.

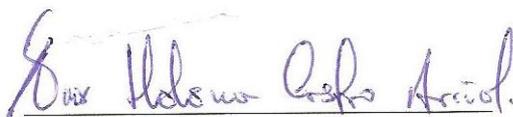
CDD 21. ed. 631. 523 3

GEISENILMA MARIA GONÇALVES DA ROCHA

**CARACTERIZAÇÃO DE GENÓTIPOS DO GERGELIM UTILIZANDO  
RAPD E MICROSSATÉLITE**

Aprovado em 24 de julho de 2012

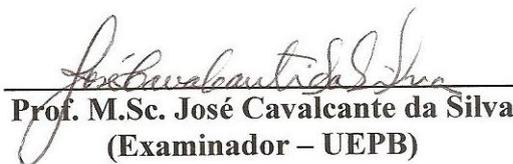
**BANCA EXAMINADORA**



**D.Sc. Nair Helena Castro Arriel  
(Orientadora – EMBRAPA ALGODÃO)**



**D.Sc. Liziane Maria de Lima  
(Examinadora – EMBRAPA ALGODÃO)**



**Prof. M.Sc. José Cavalcante da Silva  
(Examinador – UEPB)**

## **DEDICATÓRIA**

À Deus que me ilumina e abençoa em todos os momentos, sem ele nada é possível. À minha família, em especial aos meus pais, José Gonçalves e Maria de Lourdes, por toda dedicação, incentivo e amor, DEDICO.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, primeiramente, pela presença em espírito, sem ele não teria dado nenhum passo, pela oportunidade de viver cada dia, com o objetivo de realizar este sonho, mesmo com todas as dificuldades que enfrentei no decorrer desta caminhada rumo ao sucesso, obrigada senhor por todas as tuas bençãos e oportunidades concedidas.

À Universidade Estadual da Paraíba e a todos os professores que formam o corpo docente do curso de Licenciatura Plena em Ciências Biológicas, que com seus ensinamentos me proporcionaram a formação acadêmica.

À Embrapa Algodão, pela oportunidade do estágio que possibilitou desenvolvimento do presente trabalho.

À minha orientadora Dr<sup>a</sup>. Nair Helena Castro Arriel, por ter participado ativamente da minha formação, servindo como exemplo de profissionalismo, ética, simplicidade, pelos valiosos ensinamentos, conselhos, incentivo e, sobretudo pela amizade.

Ao Prof. M.Sc. Walter Fabrício Silva Martins, pela co-orientação, apoio e confiança depositada no meu trabalho.

À Dr<sup>a</sup>. Liziane Maria de Lima, pelo apoio, conselhos, contribuições, disponibilidade, e principalmente pela amizade.

Aos meus pais, exemplos de determinação e força, por toda dedicação, incentivo e amor que têm por mim, me fazendo entender que posso ir mais além, vocês são os responsáveis pela concretização deste sonho, sem vocês essa realização seria impossível. Obrigada pelos valores que me ensinaram, pelos esforços que fizeram para que eu estivesse aqui, por me proporcionar tudo o que tenho, pela confiança que depositaram em mim, enfim por contribuírem para meu sucesso e para meu crescimento como pessoa. Sou o resultado da confiança e da força de cada um de vocês. Vocês não sabem o quanto são admirados e amados!

Aos meus irmãos por permanecerem sempre ao meu lado, em especial à José Gerson (*in memoriam*), que desde a minha infância foi como um pai para mim, obrigada por todo incentivo, carinho e dedicação.

Aos meus sobrinhos Jefferson e Gustavo, lembrança viva do pai, e a pequena Ana Cecília.

Aos meus avós, em especial aos avós maternos Cícero (*in memoriam*) e Geni, esse é meu presente e minha forma de agradecer por tudo que vocês foram capazes de fazer por mim.

Aos meus tios e tias, em especial à Geruza e Dolores, pelos conselhos, carinho e ajuda que me deram, não tenho como agradecer o que foi feito por mim durante essa caminhada.

Agradeço de modo muito especial ao meu noivo Alberto, pelo apoio, amor, confiança, dedicação, respeito e companheirismo durante todos esses anos difíceis, sem você não poderia realizar esse sonho.

Aos meus amigos e amigas que me deram motivação, alegria e afeto, em especial as irmãs Rafaela e Gabriela, que estiveram sempre presente e me acompanharam em todos os momentos desta caminhada.

Aos meus queridos amigos do Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Algodão, Eveline, Milena, Morganna, Patrícia, Pollyne, Suênia e Vandrê. Obrigada pela ajuda e pelas conversas descontraídas.

Aos funcionários da Embrapa Algodão, pela disponibilidade. Em especial à Fábria, pelo apoio incondicional em todos os momentos, pelas palavras de consolo, pelos ensinamentos. À Joabson, Antônio e Seu Chico e por toda convivência na Embrapa pelo apoio e pelo empenho em dividir o conhecimento.

Aos colegas de curso, nunca me esquecerei dos momentos que passamos juntos!

À Banca Examinadora, por aceitar o convite para as considerações na melhoria deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq e à Embrapa Algodão – CNPA, pelo fornecimento de bolsas de Iniciação Científica.

Enfim, a todas as pessoas que participaram da minha vida, direta ou indiretamente, saibam que vocês são de extrema importância para mim.

Obrigada a todos!

"Há homens que lutam um dia e são bons.  
Há outros que lutam um ano e são melhores.  
Há os que lutam muitos anos e são muito bons.  
Porém, há os que lutam toda a vida.  
Esses são os imprescindíveis."

Bertolt Brecht

## CARACTERIZAÇÃO DE GENÓTIPOS DO GERGELIM UTILIZANDO RAPD E MICROSSATÉLITE

**RESUMO** – O gergelim (*Sesamum indicum* L.) é uma espécie oleaginosa, adaptada às condições edafoclimáticas das regiões tropicais. Por ser um alimento de elevado valor nutricional e econômico, há um mercado crescente para exploração de seus grãos e óleo, que podem ser usados nas indústrias oleoquímica, alimentar, farmacêutica e cosmética e até para o segmento biodiesel. Estudos de caracterização da diversidade genética podem promover a identificação de genótipos desejáveis por suas características *per se* e/ou por meio de hibridação de características desejáveis, como indeiscência de cápsulas, tolerância a doenças e produtividade. Objetivou-se, com esse trabalho, identificar por meio de técnicas de RAPD (Random Amplication of Polymorphic em DNA) e microssatélite (SSR), genótipos de gergelim com características de indeiscência ou semideiscência, agrupando os genótipos quanto à indeiscência dos frutos e identificando nos genótipos estudados fontes de genes capazes de expressar características de indeiscência dos frutos. Para realização deste trabalho, 68 genótipos de gergelim foram cultivados em casa de vegetação na sede da Embrapa Algodão, Campina Grande, PB. Amostras de tecidos foliares foram coletadas e utilizadas para a extração do DNA genômico de acordo com o protocolo CTAB (Brometo de Cetiltrimetilamônio), com modificações. A relação genética entre os 68 genótipos de gergelim foi avaliada por meio de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), utilizando-se o *primer* C19 do tipo RAPD e nove *primers* para microssatélites e o programa *Genes* para análise da diversidade genética. As análises de diversidade foram feitas com base nas estimativas de distância genética de complemento aritmético do coeficiente de Jaccard e para representação dos grupos de genótipos utilizou-se o agrupamento pelo método de otimização de Tocher, o método hierárquico UPGMA e a projeção das distâncias num plano tridimensional a fim de facilitar a identificação entre os acessos de acordo com o grau de dissimilaridade. As reações utilizando o *primer* C19, geraram 282 bandas polimórficas, de aproximadamente 750 a 2.000 pares de base, enquanto que 132 alelos foram observados nas reações de microssatélites. Os diferentes métodos de agrupamento a partir de marcadores RAPD destacaram os genótipos CNPA-SH 14, CNPA-SH 19, CNPA-SH 46, CNPA-SH 50, CNPA-SH 51 e CNPA-SH 68, como mais divergentes e com a presença da banda associada à indeiscência dos frutos. A partir dos resultados obtidos pelos métodos de agrupamento Tocher e dispersão gráfica, utilizando os dados obtidos pelos marcadores microssatélites, constatou-se que os genótipos CNPA-SH 24, CNPA-SH 35, CNPA-SH 36, CNPA-SH 38, CNPA-SH 40, CNPA-SH 42 e o CNPA-SH 45, apresentaram-se como mais divergentes. A partir dos marcadores moleculares constatou-se baixa divergência genética entre os genótipos de gergelim estudados. No entanto, dentre os genótipos analisados o CNPA-SH 68 apresentou marcas RAPD em associação a características fenotípica de indeiscência dos frutos.

**Palavras-chave** – *Sesamum indicum* L., marcador molecular, variabilidade genética.

## CHARACTERIZATION OF THE GENOTYPES SESAME USING RAPD AND MICROSATELLITE

**ABSTRACT** – The sesame (*Sesamum indicum* L.) is an oleaginous species, adapted to the ecological conditions of tropical regions. Sesame seeds are being a food of high nutritional value and cost, there is a growing market for their grain and exploitation of oil, which can be used in the oleochemical industry, food, pharmaceutical and cosmetics and even biodiesel segment. Characterization studies of genetic diversity can promote the identification of genotypes for its desirable characteristics *per se* and / or by hybridization of desirable characteristics, such as capsules indehiscence, tolerance to and productivity. The objective of this work was to identify by means of techniques of RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA) and microsatellite (SSR), sesame genotypes with characteristics of indehiscence or dehiscence semi, grouping the genotypes for indehiscence fruit and in identifying genotypes sources of genes capable of expressing indehiscence characteristics of the fruit. For this study, 68 sesame genotypes were grown in a greenhouse at the headquarters of Embrapa Cotton, Campina Grande, PB. Samples of leaf tissue were collected and used for genomic DNA extraction according to the protocol CTAB (cetyltrimethylammonium bromide), with modifications. The genetic relationships among 68 sesame genotypes was assessed by PCR (Polymerase Chain Reaction), using *primer* C19 of RAPD and nine *primers* for microsatellite and the program *Genes* for analysis of genetic diversity. Analyzes of diversity were based on estimates of genetic distance of arithmetic complement of the Jaccard coefficient and representation of the groups of genotypes was used by the grouping method of Tocher, the UPGMA method and the projection of three-dimensional distances to facilitate the identification of the access according to the degree of dissimilarity. The reactions using *primer* C19, generated 282 polymorphic bands, of approximately 750 to 2000 base pairs, while 132 alleles were observed in the reactions of microsatellites. The different clustering methods from the RAPD markers highlighted the CNPA-SH 14, CNPA-SH 19, CNPA-SH 46, CNPA-SH 50, CNPA-SH 51 and CNPA-SH 68, as more divergent and the indehiscence band presence associated with fruit. From the results obtained by cluster Tocher and graphic, using data obtained by microsatellite markers, it was found that the genotypes CNPA-SH 24, CNPA-SH 35, CNPA-SH 36, CNPA-SH 38, CNPA-SH 40, CNPA-SH 42 and the CNPA-SH 45, presented themselves as more divergent. From the molecular markers showed a low genetic divergence among the sesame genotypes studied. Among the genotypes studied the CNPA-SH 68 showed RAPD brands in association with phenotypic characteristics of fruit indehiscence.

**Keywords** - *Sesamum indicum* L., molecular markers, genetic variability.

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1</b> – Coleta de amostras de tecido foliares dos acessos de Gergelim .....	22
<b>FIGURA 2</b> – Precipitação com isopropanol (A) e formação do sedimento de DNA de gergelim (B), a partir de tecido foliar .....	23
<b>FIGURA 3</b> – Eletroforese em gel de agarose 0,8% para quantificação do DNA genômico dos genótipos de Gergelim. Lambda de 50 ng, 100 ng, 150 ng e 200 ng .....	24
<b>FIGURA 4</b> – Aplicação dos produtos da reação de microssatélite em gel de poliacrilamida 6% .....	27
<b>FIGURA 5</b> – Gergelim com folhas apresentando rudimentos foliares na parte abaxial .....	31
<b>FIGURA 6</b> – Visualização em gel de agarose 0,8% dos fragmentos amplificados gerados pela reação de RAPD utilizando o primer C19 .....	32
<b>FIGURA 7</b> – Dendograma do agrupamento UPGMA construído a partir do complemento aritmético do Coeficiente de Jaccard entre 68 genótipos de Gergelim, considerando os marcadores RAPD .....	34
<b>FIGURA 8</b> – Projeção gráfica das estimativas de distâncias de dissimilaridade de 68 genótipos de Gergelim a partir de marcadores RAPD .....	36
<b>FIGURA 9</b> – Projeção gráfica das estimativas de distâncias de dissimilaridade de 68 genótipos de Gergelim a partir de marcadores microssatélite .....	37

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1</b> – Relação dos <i>primers</i> utilizados nas PCRs dos 68 genótipos de Gergelim para os marcadores microssatélites .....	25
<b>TABELA 2</b> – Agrupamento dos 68 genótipos de Gergelim pelo método de otimização de Tocher, a partir de dados de marcadores RAPD .....	33
<b>TABELA 3</b> – Agrupamento dos 68 genótipos de Gergelim pelo método de otimização de Tocher, a partir de dados de marcadores microssatélite .....	36

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	14
2.1 Geral.....	14
2.2 Específicos .....	14
<b>3. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	15
3.1 Origem e histórico do gergelim .....	15
3.2 Característica morfoagronômica do gergelim.....	15
3.3 Importância econômica do gergelim.....	17
3.4 Marcadores moleculares .....	18
3.4.1 Marcadores RAPD.....	19
3.4.2 Marcadores Microssatélites – SSRs.....	19
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	21
4.1. Genótipos estudados .....	21
4.2. Extração de DNA genômico .....	21
4.3. Quantificação e diluição do DNA extraído.....	23
4.4. Amplificação do DNA por PCR .....	24
4.5. PCRs utilizando os marcadores RAPD e Microssatélite .....	25
4.5.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida 6% .....	26
4.5.2 Coloração com nitrato de prata.....	27
4.6. Determinação da diversidade genética entre os acessos de gergelim .....	28
4.7. Análise dos dados .....	28
4.7.1 Estimativa de similaridade/dissimilaridade genética por RAPD .....	28
4.7.2 Estimativa de similaridade/dissimilaridade genética por Microssatélite .....	29
<b>5. RESULTADOS E DISCURSÃO</b> .....	31
5.1. Diversidade genética.....	32
5.1.1 Análise do marcador RAPD .....	32
5.1.1 Análise do marcador microssatélite .....	36
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	38
<b>7. REFERÊNCIAS</b> .....	39

## 1. INTRODUÇÃO

O gergelim (*Sesamum indicum* L.) é uma cultura oleaginosa, adaptada às condições semiáridas de diversas partes do mundo, de alto potencial econômico, com possibilidades de exploração tanto no mercado nacional como internacional. Por apresentar elevada concentração de óleo em suas sementes em torno de 50%, esta oleaginosa apresenta alto potencial para a indústria farmacêutica (ARRIEL et al., 2007). O óleo extraído das sementes também pode ser utilizado na indústria alimentar e química e na culinária destacando-se a produção de tempero e de farinha os quais podem ser usados na elaboração de produtos alimentícios como biscoitos, pães, doces, etc. Na indústria química, o óleo de gergelim pode ser utilizado na fabricação de margarinas, cosméticos, perfumes, remédios, lubrificantes, sabão, tintas e inseticidas (BELTRÃO et al., 1994; FIRMINO, 1996).

O gergelim é cultivado em mais de 71 países, em especial da África e Ásia, sendo o Brasil um pequeno produtor (BELTRÃO et al., 2008). A demanda por produtos a base de gergelim cresceu 550% entre 1961 a 2001 (LANGHAM e WIEMERS, 2002). A produção mundial está estimada em 3,5 milhões de toneladas, obtidas em 7,5 milhões de hectares, com uma produtividade de 516 kg/ha, destacando-se como principais produtores Índia, Sudão e Myanmar. Em 2009, o Brasil produziu 16.000 toneladas dessa oleaginosa em 25 mil hectares com rendimento em torno de 640 kg/ha (FAO, 2012), essa produção é oriunda basicamente de pequenos e médios produtores dos Estados de GO, MT, MG, SP, PB, BA, PE, CE, PI e RN que utilizam a mão de obra familiar (BARROS et al., 2001).

O cultivo do gergelim, embora com produtividade inferior a maioria das oleaginosas cultivadas, merece incentivo na sua exploração por representar uma excelente opção agrícola ao alcance do pequeno e médio produtor, exigindo práticas agrícolas simples e de fácil assimilação. A exploração econômica desta oleaginosa é uma excelente alternativa para as regiões mais áridas do Nordeste (Sertão e Seridó) por possuir um grau satisfatório de resistência à seca (LEVANTAMENTO SISTEMÁTICO..., 1997). O incentivo a sua exploração resolveria um dos grandes problemas do setor primário da região Nordeste, que é a escolha de culturas que possam alimentar diretamente a própria família do produtor e possibilitem renda com mercado garantido (BELTRÃO, 1995).

Atualmente, produtores de diversas localidades do País têm interesse no cultivo desta oleaginosa, para tanto é imprescindível que estudos de diversidade genética sejam conduzidos a fim de se identificar genótipos com alto potencial de produção de sementes e conteúdo de

óleo e adaptados a diferentes condições edafoclimáticas. Neste contexto, estudos de caracterização da diversidade genética podem promover a obtenção de genótipos desejáveis por suas características *per se* e/ou por meio de hibridação de características desejáveis, como indeiscência de cápsulas, tolerância a doenças e produtividade (ARRIEL, 2004).

Diversidade genética é a capacidade de uma espécie, população ou progênie de expressar diferentes fenótipos em função da composição genética dos indivíduos, como resultado da ação dos diferentes alelos em um determinado ambiente (ARRIEL, 2004). Ressalta-se que o conhecimento da diversidade genética de populações é importante para se direcionar as diferentes estratégias de conservação do germoplasma e uso do recurso genético disponível em programas de melhoramento da espécie.

Nos trabalhos de melhoramento do gergelim desenvolvidos pela Embrapa Algodão, ensaios de avaliação de linhagens estão sendo conduzidos em rede nas regiões Centro-Oeste, Nordeste e Norte como estratégia consolidada no Projeto Melhoramento de Oleaginosas. Até o momento as cultivares de gergelim desenvolvidas pela Embrapa Algodão são adaptadas especificamente ao cultivo e colheita manual, entretanto, já teve início a recombinação dentro do germoplasma existente para obtenção de materiais com características adequadas ao cultivo mecanizado. Além disso, linhagens de gergelim de frutos indeiscentes encontram-se em avaliação para futuro lançamento como cultivar.

O gergelim, por ser uma cultura que pode expressar diferentes características quanto ao hábito de crescimento, ramificações, deiscência dos frutos, cor das sementes, tolerância às doenças, entre outros (ARRIEL, 2004), justifica trabalhos de caracterização de acessos que poderão potencializar a exploração de características desejáveis a partir de seleção e/ou hibridação de genótipos, como por meio de técnicas de marcadores moleculares utilizando RAPD e microssatélite.

Desde o descobrimento do primeiro mutante indeiscente, pesquisadores têm dado ênfase ao desenvolvimento de cultivares que retenham as sementes após a maturação, em função das perdas de sementes que podem chegar até 70%, pois, quando fisiologicamente maduras as cápsulas se abrem e as sementes caem ao chão. Para tanto é importante a caracterização da diversidade para exploração dos caracteres de indeiscência dos frutos, sementes aderidas à placenta ou cápsulas papiráceas. Neste sentido, estudos de caracterização moleculares que possam identificar genótipos de gergelim com tais características podem auxiliar na seleção de genótipos promissores.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Geral**

Caracterizar a divergência genética de 68 genótipos de gergelim potencialmente promissores quanto à indeiscência das cápsulas.

### **2.2 Específicos**

- Identificar por meio de técnicas de RAPD e microssatélite, genótipos de gergelim com características de indeiscência ou semideiscência;
- Agrupar os genótipos superiores quanto à indeiscência dos frutos;
- Indicar nos genótipos estudados fontes de genes capazes de expressar características de indeiscência dos frutos.

### **3. REVISÃO DE LITERATURA**

#### **3.1 Origem e histórico do gergelim**

O gergelim, espécie pertencente à família pedaliácea, é uma das oleaginosas mais antigas cultivadas pelo homem (BELTRÃO, 2001). Seu local de origem é incerto sendo um tema de importante discussão. Muitos autores sugerem que o gergelim é de origem africana, enquanto para outros o gergelim se originou na Ásia (PHAM, 2011).

A planta do gergelim é cultivada no Egito desde os tempos dos faraós, onde já se aproveitava o gergelim para obtenção do óleo. Os impérios entre os rios Tigre e Eufrates (Ásia Menor) cultivavam comercialmente o gergelim e os indianos consideravam as sementes do gergelim quase sagradas (BELTRÃO, 2001).

Chegou ao Nordeste do Brasil trazido pelos portugueses no século XVI e foi plantado em pequenas áreas. Os grãos obtidos eram consumidos, por agricultores, e havia raros excedentes para comercialização.

Hoje, o gergelim é amplamente cultivado como uma oleaginosa na Índia, China, Coréia, Japão, Turquia, Tailândia, Vietnã e Camboja, bem como sobre os continentes Americano e Africano (PHAM, 2011).

#### **3.2 Característica morfoagronômica do gergelim**

A importância de uma característica morfoagronômica para caracterização de germoplasma, está em função de seu poder discriminante entre os acessos e da sua estabilidade de manifestação. Os caracteres dispensáveis em estudos de diversidade genética são aqueles relativamente invariantes, altamente influenciados pelo ambiente ou são redundantes por estarem correlacionados a outros caracteres (CRUZ e REGAZZI, 1994). Enquanto que, as variáveis que mais contribuem para divergência dos acessos devem ter baixas correlações entre si, de forma que sua permanência no estudo seja responsável por um tipo de informação exclusiva e a ação conjunta das mesmas seja complementar para a descrição dos genótipos analisados (SINGH e UNREA, 1995).

Apesar de fácil monitoramento, muitas vezes a obtenção de dados morfológicos e agronômicos é um processo demorado, dependendo do desenvolvimento da planta, em que a expressão dessas características é frequentemente influenciada por fatores do ambiente. Além disso, se a magnitude de variação induzida pelo ambiente é grande em comparação com a variação genética, a estimativa de diversidade baseada em dados morfológicos pode representar uma idéia errônea da diversidade genética entre indivíduos.

O gergelim é uma planta anual, cujos caracteres morfológicos são muito inconstantes na mesma cultivar, na mesma planta e até no mesmo ramo como, por exemplo, o formato das folhas e a posição das flores, o número de frutos por axila, o número de lojas por fruto etc., e diferem ainda no tamanho do fruto. As folhas são alternas, as da parte inferior da planta adulta são mais largas, irregularmente dentadas ou lobadas, enquanto as da parte superior são lanceoladas. O caule é ereto, ramificado ou não, com ou sem pêlos e de seção geralmente quadrangular, podendo apresentar coloração verde-claro, avermelhado ou verde-escuro (SILVA, 1993).

As flores são completas e axilares, gamossépalas, em número de 1 a 4 por axila foliar. As flores individuais têm um pequeno cálice dividido em cinco segmentos de 3 a 7 mm de comprimento. A corola é tubular, com um lábio inteiro superior e três lábios lobados mais embaixo, sendo o do meio mais largo que os dois lóbulos laterais. A cor vai do branco ao violáceo. Apresentam quatro estames didínamos, arranjados em pares, um par mais baixo que o outro, soldados na base do maior lábio do tubo da corola. Em alguns casos, um quinto estame está presente, porém normalmente não tem função. As anteras são de cor branca ou amarela, com 1 a 2 mm de comprimento. Em tipos macho estéril elas permanecem verdes fechadas e não se desenvolvem em tamanho através da antese. O grão de pólen é amarelo-claro. O ovário é súpero e esverdeado, com estilete filiforme e claro e, em geral, apresenta dois carpelos e quatro lojas, pois cada carpelo tem um septo. No gergelim comum bicarpelar o estilo é normalmente cilíndrico, terminando num estigma com dois lóbulos peludos. No gergelim tetracarpelar, o estigma é achatado e tem um estigma de quatro lóbulos (YERMANOS, 1980).

O fruto é uma cápsula alongada, mais ou menos pilosa, normalmente com quatro lojas, podendo variar para seis a oito ou, raramente, dez lojas. Na mesma planta, o número de frutos por axila varia de 1 a 3. Quando o fruto está perfeitamente maduro e seco, é normalmente deiscente, pela parte superior, por onde as sementes se libertam (MAZZANI, 1983; SILVA, 1993).

As sementes são pequenas (3 mm de comprimento, 2 mm de largura e 1 mm de espessura), o peso de 1000 sementes varia de dois a quatro gramas, dependendo da cultivar e do ambiente e a cor das sementes varia do branco ao preto; estas últimas são mais utilizadas na preparação de medicamentos (SILVA, 1993).

A caracterização morfológica de plantas fornece subsídios para melhor entendimento da planta como um todo, auxiliando na diferenciação de espécies e compreensão de estudos fisiológicos. O gergelim possui uma ampla variação morfológica e o conhecimento dessa variabilidade é uma importante etapa no processo de seleção e exploração dos caracteres desejáveis.

### **3.3 Importância econômica do gergelim**

O gergelim é uma opção de cultivo rentável, tradicionalmente explorado em pequenas e médias propriedades agrícolas nordestinas, principalmente por ser tolerante à seca, de fácil cultivo e ampla adaptabilidade às condições edafoclimáticas. Socialmente, constitui-se em alternativa de baixo custo para alimentação humana e animal, em que a alta qualidade nutricional dos grãos supriria a carência alimentar dos envolvidos com esta atividade constituindo-se ainda em importante estratégia para ocupação de mão de obra familiar e elevação da renda dos agricultores, e principalmente contribuiria para fixação do pequeno produtor no campo. Além de ser um alimento de elevado valor nutricional importante sob o aspecto de segurança alimentar, há um mercado crescente para exploração de seus grãos e óleo, que podem ser usados em vários produtos alimentícios, cosméticos, farmacêuticos e oleoquímicos e até para o segmento biodiesel (ARRIEL, 2007).

O gergelim apresenta grande potencial econômico, devido às possibilidades de exploração, tanto no mercado nacional como internacional. A comercialização mundial desta oleaginosa está em plena ascensão, em função da quantidade de produtos industrializáveis para o consumo, gerando demanda do produto in natura. Em países como Índia, China, Japão e Sudão, o cultivo do gergelim representa uma exploração de grande importância econômica (BARROS et al., 2001).

As sementes contêm cerca de 50% de óleo de excelente qualidade, semelhante ao óleo de oliva, que pode ser usado nas indústrias alimentar e química. Na indústria alimentar é usado, principalmente, na fabricação de pães, biscoitos, bolos e doces, além de outras

utilizações na culinária caseira. Na indústria química o óleo pode ser usado em cosméticos, perfumes, sabões, tintas, remédios e lubrificantes (FIRMINO, 1996).

O óleo é muito rico em ácidos graxos insaturados, como oléico (47%) e linoleico (41%), e apresenta vários constituintes secundários que são importantíssimos na definição de suas qualidades, em especial a estabilidade química (BELTRÃO et al., 1994). Nas Regiões Centro-Oeste, Norte e Nordeste, o gergelim faz parte do consumo popular da classe de baixa renda, apresentando-se como mais uma alternativa de cultivo e fonte de proteínas para pequenos e médios produtores (BARROS et al., 2001).

### **3.4 Marcadores moleculares**

A utilização das técnicas da biologia molecular como ferramenta nos programas de melhoramento genético tem propiciado maior rapidez, segurança e eficiência na seleção dos genótipos.

Os marcadores moleculares são ferramentas eficazes no estudo dos genomas, pois detectam polimorfismos diretamente no DNA, não sofrem influência ambiental e são independentes do estágio de desenvolvimento da planta (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998). Estes marcadores são fundamentados na amplificação de fragmentos de DNA por (PCR) Reação em Cadeia da Polimerase, sendo utilizados, no monitoramento da variabilidade genética, identificação de indivíduos ou famílias divergentes, construção de mapas genéticos e identificação de locos relacionados aos caracteres quantitativos (PIGATO e LOPES, 2001).

Segundo Ferreira e Grattapaglia (1998), os marcadores moleculares são definidos como todo e qualquer fenótipo molecular proveniente de um gene expresso ou de um segmento específico de DNA. Estes são segmentos de DNA que estão ligados a locos que determinam características de interesse (ALZATE-MARIN et. al., 2005).

Existem diversas técnicas para marcadores moleculares, são elas: RFLP (Polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição), RAPD (Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso), AFLP (Polimorfismo no comprimento de fragmentos amplificados) e microssatélite (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998; MELO et al., 2001). Essas técnicas têm sido bastante empregadas na caracterização de espécies, e para o gergelim os principais marcadores utilizados tem sido RAPD e Microssatélites.

### 3.4.1 Marcadores RAPD

Os marcadores RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), têm se difundido rapidamente. A possibilidade de se obter um grande número de marcadores sem qualquer informação prévia sobre a genética do organismo, a rapidez e simplicidade na aquisição dos dados, o baixo custo e acessibilidade desta tecnologia têm sido os principais fatores que levaram à sua rápida adoção por diversos grupos de pesquisa no mundo, sendo provavelmente, o marcador molecular de maior utilização para acessar a variabilidade ao nível de DNA e especialmente útil em análise intraespecífica. Estes marcadores têm a vantagem de amplificar tanto regiões do genoma que podem ser transcritas e/ou traduzidas, como regiões não codificantes (WILLIAMS et al., 1990; FERREIRA e GRATTAPLAGIA, 1998).

### 3.4.2 Marcadores Microssatélites – SSRs

Marcadores microssatélites, também conhecidos como sequências simples repetidas, ou *Simple Sequence Repeats* (SSR), são ferramentas adequadas e essenciais em genética de plantas, por serem abundantes e uniformemente distribuídos por todo genoma, codominantes e multialélicos (OLIVEIRA et al., 2006; OLIVEIRA e SILVA, 2008).

Microssatélites são regiões do genoma dos organismos eucariontes, formadas de 2 a 5 nucleotídeos em cadeia, e distribuídos aleatoriamente no genoma dos organismos (SABATINI, 2003).

Os SSRs podem ser encontrados em regiões codificadoras ou não codificadoras de sequências de DNA de organismos superiores (TAUTZ e RENZ, 1984; GUPTA et al., 2000). Além disso, a presença de microssatélites em transcritos de genes conhecidos sugere que eles podem estar envolvidos na expressão ou função gênica (KANTETY et al., 2002).

Marcadores moleculares baseados em SSR são frequentemente usados para uma variedade de aplicações em genética de plantas e melhoramento, devido a sua alta reprodutibilidade, alto conteúdo informacional, alto grau de polimorfismo, herança codominante, natureza multialélica, relativa abundância e boa cobertura do genoma (SIMKO, 2008; POWELL et al., 1996).

Existe um grande número de usos e aplicações para marcadores moleculares, mas a maioria esta associada com a variação genética, caracterização quantitativa de características multigênicas, análise de diversidade genética e evolução (KANTETY et al., 2002).

O uso de marcadores no melhoramento genético de plantas é importante para auxiliar a seleção de genótipos. Diversos trabalhos mostram a eficiência dos marcadores no auxílio de programas de melhoramento genético de plantas, a partir da Seleção Assistida por Marcadores – SAM (ALZATE-MARIN et. al., 2005).

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho é uma continuidade do estudo que teve início em 2010. Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação, localizada na Embrapa Algodão, situada na cidade de Campina Grande – PB, para avaliar características morfológicas dos genótipos de Gergelim. Nesta segunda etapa foi determinada a diversidade genética entre os acessos por meio de marcadores RAPD e microssatélite, conforme detalhamento nos sub-itens a seguir:

### 4.1 Genótipos estudados

Foram avaliados 68 genótipos de gergelim denominados: CNPA-SH 01, CNPA-SH 02, CNPA-SH 03, CNPA-SH 04... CNPA-SH 68. Os referidos genótipos são provenientes da seleção feita a partir de ensaio de Gergelim da Embrapa Algodão, conduzido em campo no município de Santa Helena-GO.

### 4.2 Extração de DNA genômico

Para extração de DNA foi utilizado o método CTAB proposto por Ferreira e Grattapaglia (1998) e modificado por Vidal, Coutinho e Hoffmann (2003) e a maceração dos tecidos foi realizada segundo Batista et al. (2005).

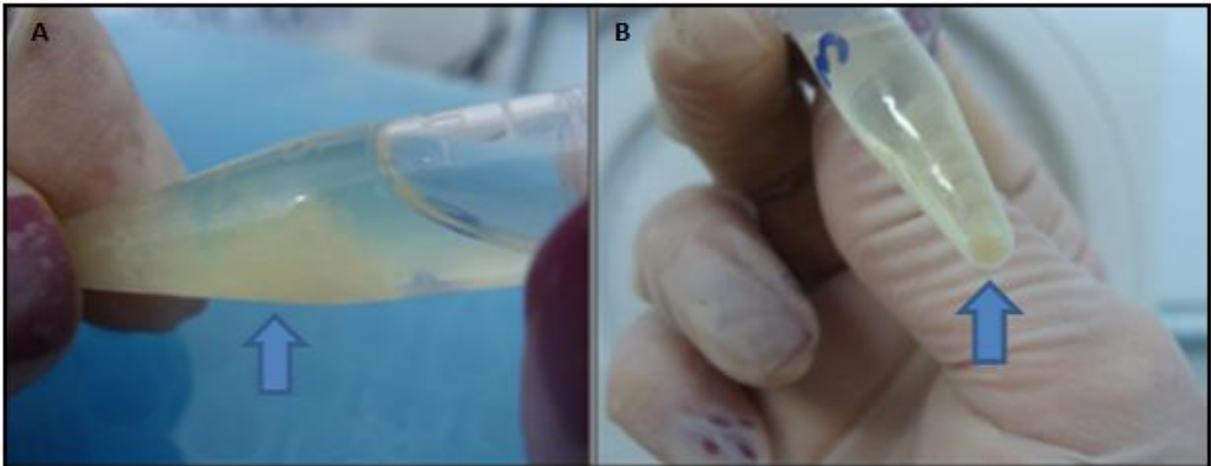
Tecidos de folhas novas em fase de crescimento foram coletados em gelo (figura 1) e armazenados à -80°C. Amostras de tecidos foram colocados em tubos de 2 ml, previamente identificados, contendo uma esfera de inox de 6 mm de diâmetro e 600 µl de tampão CTAB (NaCl 1,4 M; Tris HCl pH 8,0 100 mM; EDTA 20 mM; CTAB 2%; β-Mercaptoetanol 0,2% e água Milli-Q) pré-aquecido a aproximadamente 65°C. Logo após, as amostras foram maceradas no *minibead*, homogeneizadas em vórtex e incubadas em banho-maria a 65°C por 30 minutos, sendo homogeneizadas por inversão a cada 5 minutos. Ao homogeneizado foram adicionados 600 µl de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1 V/V) e agitou-se

manualmente por aproximadamente cinco minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm durante cinco minutos.



**Figura 1.** Coleta de amostras de tecido foliares dos acessos de Gergelim (Foto: Geisenilma M. G. da Rocha).

Em novos tubos identificados foi realizada a transferência da fase aquosa (fase superior) e adicionados 500  $\mu$ l de isopropanol gelado, misturando-se suavemente por inversão dos tubos, várias vezes, até que se formasse o sedimentado (figura 2).



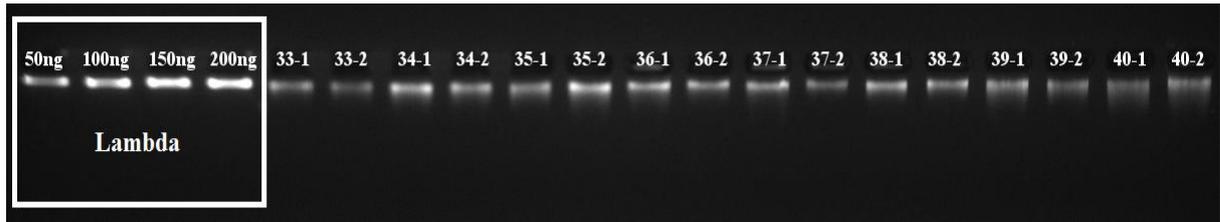
**Figura 2.** Precipitação com isopropanol (A) e formação do sedimento de DNA de gergelim (B), a partir de tecido foliar (Foto: Geisenilma M. G. da Rocha).

Após este procedimento, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 12.000 rpm e, logo após, o sobrenadante foi descartado. O precipitado (pellet) foi lavado duas vezes com 500  $\mu$ l de etanol 70%, pelo intervalo de 5-10 minutos e uma vez com 500  $\mu$ l de etanol absoluto, por 3 minutos em incubação no gelo.

O precipitado foi seco à temperatura ambiente e ressuspendido em 150  $\mu$ l de TE (Tris-HCl 1M, EDTA 500 mM pH 8,0), contendo 10 ng de RNase.

#### 4.3 Quantificação e diluição do DNA extraído

Para quantificação, 2  $\mu$ l de DNA genômico foram acrescidos de 4  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O Milli-Q autoclavada, 2  $\mu$ l de tampão de amostra (azul de bromofenol 0,25% e sacarose 40%) e 2  $\mu$ l de *Sybr Green* e analisados em eletroforese por gel de agarose a 0,8% imerso em TBE 1x (Tris-HCl 89 mM; EDTA 2 mM, ácido bórico 89 mM), a 120 volts. Como padrão para determinação da concentração das amostras utilizou-se quantidades conhecidas do fago  $\lambda$  (50, 100, 150 e 200 ng). Após aproximadamente 50 minutos, o gel foi exposto à radiação ultravioleta, para visualização do DNA. E, comparando a intensidade da banda das amostras com as do DNA padrão Lambda, foi realizada a quantificação das mesmas (Figura 3).



**Figura 3.** Eletroforese em gel de agarose 0,8% para quantificação do DNA genômico dos genótipos de Gergelim. Lambda de 50 ng, 100 ng, 150 ng e 200 ng (Foto: Geisenilma M. G. da Rocha).

De posse dos valores das concentrações de cada amostra, quando necessário, realizou-se a diluição da suspensão de DNA a uma concentração de 10 ng/ $\mu$ l, ideal para PCR. Para esse processo, utilizou-se o cálculo da relação concentração-volume com a seguinte fórmula:

$$C1.V1 = C2.V2$$

Em que:

**C1** → concentração inicial da solução estoque

**V1** → volume inicial da solução estoque

**C2** → concentração final da diluição

**V2** → volume final da diluição

#### 4.4 Amplificação do DNA por PCR

Na amplificação do DNA, foi adotado a metodologia sugerida por Diniz (2008) a qual utilizando o *primer* RAPD C19 (5' TCGGCGGTTC 3'), apresentou resultados satisfatórios quanto às características de indeiscência e semideiscência dos frutos. Enquanto que os *primers* microssatélites utilizados (Tabela 1) foram adquiridos usando as sequências de *primers* desenvolvidas por Dixit et al. (2005).

**Tabela 1:** Relação dos *primers* utilizados nas PCRs dos 68 genótipos de Gergelim para os marcadores microssatélites.

Nº DO PRIMER	SEQUÊNCIA
1	F: 5'-TCATATATAAAAAGGAGCCCAAC-3' R: 5'-GTCATCGCTTCTCTCTTCTTC-3'
2	F: 5'-GGAGAAATTTTCAGAGAGAAAAA-3' R: 5'-ATTGCTCTGCCTACAAATAAAA-3'
3	F: 5'-CCCAACTCTTCGTCTATCTC-3' R: 5'-TAGAGGTAATTGTGGGGGA-3'
4	F: 5'-TTTTCTGAATGGCATAGTT-3' R: 5'-GCCCAATTTGTCTATCTCCT -3'
5	F: 5'-GCAGCAGTTCGGTTCTTG-3' R: 5'-AGTGCTGAATTTAGTCTGCATAG-3'
6	F: 5'-CCACTCAAATTTTCACTAAGAA-3' R: 5'-TCGTCTTCCTCTCTCCCC-3'
7	F: 5'-GCAAACACATGCATCCCT-3' R: 5'-GCCCTGATGATAAAGCCA-3'
8	F: 5'-TTTCTTCCTCGTTGCTCG-3' R: 5'-CCTAACCAACCACCCTCC-3'
9	F: 5'-CCATTGAAAACCTGCACACAA-3' R: 5'-TCCACACACAGAGAGCCCC-3'

No preparo da reação de cada PCR incluiu-se um controle negativo, ou seja, uma amostra que continha todos os reagentes, exceto DNA genômico. Tal controle não deve apresentar amplificação, uma vez que não possui o molde para que a reação ocorra, o que viabiliza a confiabilidade dos fragmentos obtidos, servindo também para identificar possíveis contaminações.

#### 4.5 PCRs utilizando os marcadores RAPD e Microssatélite

Para as análises de RAPD, foram realizadas reações de amplificação de acordo com a metodologia descrita por Williams et al. (1990), utilizando as seguintes concentrações finais em um volume de 20 µl: DNA genômico (20 ng), tampão da reação (1x), MgCl<sub>2</sub> (6,25 mM), BSA (0,006 mg), dNTPs (0,25 mM), *primer* (0,38 µM), Taq DNA polimerase (1,5 unidades) e completando com água ultrapura autoclavada. As reações foram conduzidas em um termociclador com o seguinte programa: desnaturação inicial de 94°C por 3 minutos; 40 ciclos de 94°C por 15 segundos, 35°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto; e extensão final a 72°C

por 7 minutos. Foi utilizado primer C19 da série Operon para as amplificações. Ao término das reações, as amostras foram mantidas a 4°C até o momento da sua aplicação.

Aos produtos das reações, foram adicionados 2,5 µl de tampão de amostra (azul de bromofenol 0,25% e sacarose 40%) e 2,5 µl de *Sybr Green*, sendo posteriormente separados em eletroforese a 0,8% de gel de agarose a 120 volts e fotodocumentados.

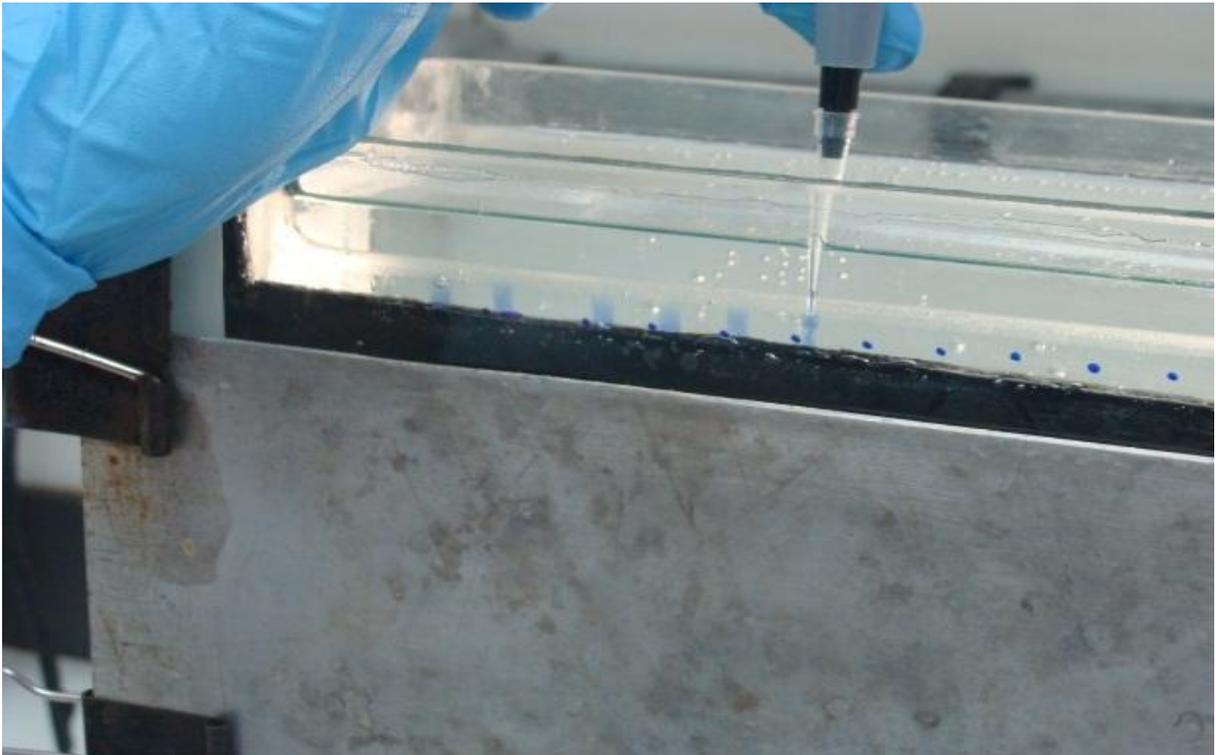
Nas análises por microssatélite, foram realizadas reações de amplificação dos locos microssatélites conduzidas seguindo metodologia proposta por Pham (2011). Para a reação de PCR foram utilizadas as seguintes concentrações finais em um volume de 20 µl: DNA genômico (20 ng), tampão da reação (1x), MgCl<sub>2</sub> (6,25 mM), BSA (0,006 mg), dNTPs (0,25 mM), primer (0,4 µM) *forward* e *reverse*, Taq DNA polimerase (1,5 unidades) e completando com água ultrapura autoclavada. O programa de amplificação foi realizado com um ciclo inicial de 3 minutos a 94°C, seguido de 35 ciclos a 94°C por 45 segundos, 55°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto; e extensão final a 72°C por 1 minuto. Os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida 6%. Utilizando o marcador (DNA Ladder – Fabricante BioLabs) de 50 pares de base.

#### **4.5.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida 6%**

Foram separadas duas placas de vidros, lavadas e limpas com álcool etílico 70% e álcool etílico absoluto. A placa menor foi tratada com impermeabilizador de vidro, distribuído de forma homogênea com papel toalha por toda superfície do vidro com três repetições. A placa de vidro maior foi tratada com uma solução de fixação contendo 5 µl de Bind silane, 5 µl de ácido acético e 990 µl de álcool etílico absoluto, esperando-se 30 minutos para secagem completa.

O gel de poliacrilamida 6% foi preparado utilizando-se 70 ml de solução acrilamida-bisacrilamida (40% P/V), contendo uréia (7 M), adicionado de 350 µl de persulfato de amônia (10%) e 140 µl de TEMED (N,N,N',N' – Tetrametilenodiamina). Após o preparo, a solução foi homogeneizada e distribuída por entre os vidros de forma sucessiva e rápida para evitar a formação de bolhas de ar, em seguida foi colocado um pente para formação dos poços, posteriormente aguardou-se aproximadamente 1 hora para a polimerização da solução.

Antes da aplicação do gel, os produtos da reação foram desnaturados com tampão de amostra (Formamida 95%; EDTA 0,5 M – pH 8,0 e Azul de Bromofenol 5 mg) por cinco minutos a 95°C e imediatamente colocados em gelo. Os produtos da amplificação foram separados por eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida 6% (Figura 4) a 60 watts, utilizando tampão TBE 1X (0,09 M de tris, 0,09 M de ácido bórico e 2 mM de EDTA pH 8,0).



**Figura 4.** Aplicação dos produtos da reação de microssatélite em gel de poliacrilamida 6% (Foto: Geisenilma M. G. da Rocha).

#### 4.5.2 Coloração com nitrato de prata

Os géis de poliacrilamida foram corados com nitrato de prata seguindo método descrito por Creste et al. (2001). O gel foi fixado com solução contendo etanol 10% (v/v) e ácido acético 1% (v/v) por 10 minutos e lavado com água destilada por 1 minuto. Em seguida, foi incubado com solução de ácido nítrico 1% (v/v) por 3 minutos e lavado com água destilada por 1 minuto. Adicionou-se nitrato de prata 0,2% (p/v) por 20 minutos (no escuro) e,

posteriormente, foi procedida à lavagem do gel por duas vezes com água destilada por 30 segundos. Para revelação, utilizou-se a solução reveladora (30 g.L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> e formaldeído 37%) gelada até o aparecimento das bandas. A reação foi interrompida com solução de ácido acético 5% (v/v) por 5 minutos. Finalizando, o gel corado foi lavado com água destilada por 10 minutos.

#### **4.6 Determinação da diversidade genética entre os acessos de gergelim**

Na análise da diversidade genética foi utilizado o programa *Genes* (CRUZ, 2008). Nas avaliações dos géis, cada banda foi considerada uma variável qualitativa. No caso do RAPD, cada fragmento amplificado foi tratado como marcador dominante e cada locus considerado como dois alelos com um amplificável e outro nulo. No caso de microsatélite, cada pico foi considerado como um alelo em um locus codominante.

#### **4.7 Análise dos dados**

##### **4.7.1 Estimativa de similaridade/dissimilaridade genética por RAPD**

Cada produto de amplificação do PCR foi considerado um marcador RAPD, os quais foram visualizados com presença ou ausência de bandas em um gel de agarose.

Todas as amplificações foram repetidas pelo menos duas vezes e somente as bandas reprodutíveis foram consideradas para análises.

Nas avaliações dos géis, cada banda é considerada uma variável qualitativa, atribuindo-se o valor 1 na presença, e 0 na ausência. Assim sendo, quando dois genótipos diferiram no mínimo em uma banda, foram considerados diferentes. De posse desses dados foi construída uma matriz de 0 a 1 e a estimativa de similaridade genética ( $S_{gij}$ ) entre cada par de genótipos foi calculada pelo coeficiente de Jaccard (J).

O coeficiente de Jaccard é definido pela seguinte expressão:

$$S_{ij}^{\text{Jaccard}} = \frac{a}{a + b + c}$$

Em que:

**s<sub>ij</sub>**: similaridade genética entre o par de cultivares i e j.

**a**: presença da banda em ambos os genótipos (número de contagens de concordância do tipo 1 1),

**b**: presença da banda no genótipo i e ausência em j (número de discordância do tipo 1 0),

**c**: ausência da banda em i e presença em j (número de contagens de discordância do tipo 0 1).

As similaridades derivadas destes coeficientes foram transformadas em medidas de distância genética pela seguinte expressão:  $dg_{ij} = 1 - s_{ij}$ .

Este coeficiente foi escolhido devido às suas propriedades matemáticas, em que desconsidera a ausência de bandas como sinônimo de similaridade genética e por atribuir diferentes pesos à presença conjunta de bandas (DIAS, 1998; CRUZ e CARNEIRO, 2003).

A partir da matriz de dissimilaridade estimada pelo coeficiente de Jaccard, os acessos foram agrupados pelo método hierárquico aglomerativo da média aritmética entre pares não ponderados (UPGMA) e a representação simplificada das distâncias genéticas foi feita através de um dendograma, a fim de facilitar a identificação entre os acessos de acordo com o grau de (dis)similaridade (CRUZ, 2008).

#### 4.7.2 Estimativa de similaridade/dissimilaridade genética por microsatélite

Nas avaliações dos géis, as bandas foram resentedas por valores iguais a 0, 1 ou 2.

Em que:

**0:** indica ausência do alelo

**1:** indica uma cópia do alelo (indivíduo heterozigoto)

**2:** indica duas cópias do alelo (indivíduo homozigoto).

De posse desses dados foi construída a matriz com os valores 0, 1 e 2. A estimativa de (dis)similaridade genética foi calculada para o conjunto de variáveis multicategóricas por meio de complemento (D) do índice  $S_{ii}$ .

$$D_{ii} = 1 - S_{ii} = \frac{C}{C + D}$$

Em que:

**C:** total de concordância de categorias para todas as variáveis consideradas;

**D:** total de discordância de categorias para todas as variáveis consideradas.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em todas as 68 progênies, as extrações de DNA total foram realizadas com êxito, fornecendo material suficiente para a realização dos experimentos. Cada amostra foi devidamente quantificada e diluída à concentração ideal para realização das PCRs.

No gergelim a presença de rudimentos foliares pode estar associada à indeiscência dos frutos. Verificou-se que as plantas do genótipo CNPA-SH 68 apresentaram rudimentos foliares nas axilas das nervuras da parte abaxial de algumas folhas do ápice dessas plantas (Figura 5).



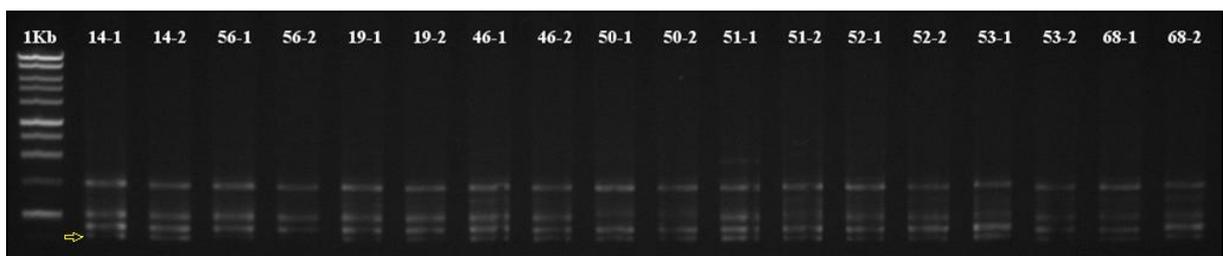
**Figura 5.** Gergelim com folhas apresentando rudimentos foliares na parte abaxial (Foto: Geisenilma M.G. da Rocha).

## 5.1 Diversidade genética

### 5.1.1 Análise do marcador RAPD

O sucesso na identificação de uma marca molecular diretamente relacionada à característica de indeiscência amplia a possibilidade, de se prospectar um maior número de acessos que apresentem marcas polimórficas associadas a genótipos com características de frutos indeiscentes (DINIZ, 2008), para confirmação e confiabilidade da marca associada à característica de indeiscência dos frutos é imprescindível à repetição de um maior número reações. Após a confirmação do marcador, este pode ser convertido em regiões de sequências específicas, o que auxiliaria o estudo individual de genótipos do banco de germoplasma de gergelim para característica de indeiscência dos frutos em genótipos ou populações segregantes.

No presente trabalho as reações de PCR utilizando o primer C19, geraram 282 bandas polimórficas, de aproximadamente 750 a 2.000 pares de base, com o marcador Leader (1Kb – Fabricante Amresco) de 10.000 pares de base (Figura 6). Observa-se a presença da marca associada à indeiscência dos frutos em alguns genótipos de gergelim, resultado idêntico ao obtido por Diniz (2008). Estes resultados auxiliarão sobremaneira o programa de melhoramento do gergelim a partir da seleção assistida por marcadores associados a tais características.



**Figura 6.** Visualização em gel de agarose 0,8% dos fragmentos amplificados gerados pela reação de RAPD utilizando o primer C19 (Foto: Geisenilma M. G. da Rocha).

- **Método de agrupamento – Tocher**

Para análise de diversidade dentro dos acessos o agrupamento pelo método de otimização de Tocher (Tabela 2) identificou a formação de sete grupos, em que os genótipos CNPA-SH 14, CNPA-SH 19, CNPA-SH 46 e CNPA-SH 68, foram agrupados no Grupo F. Os genótipos CNPA - SH 50 e o CNPA - SH 51 foram os mais divergente (Grupo G).

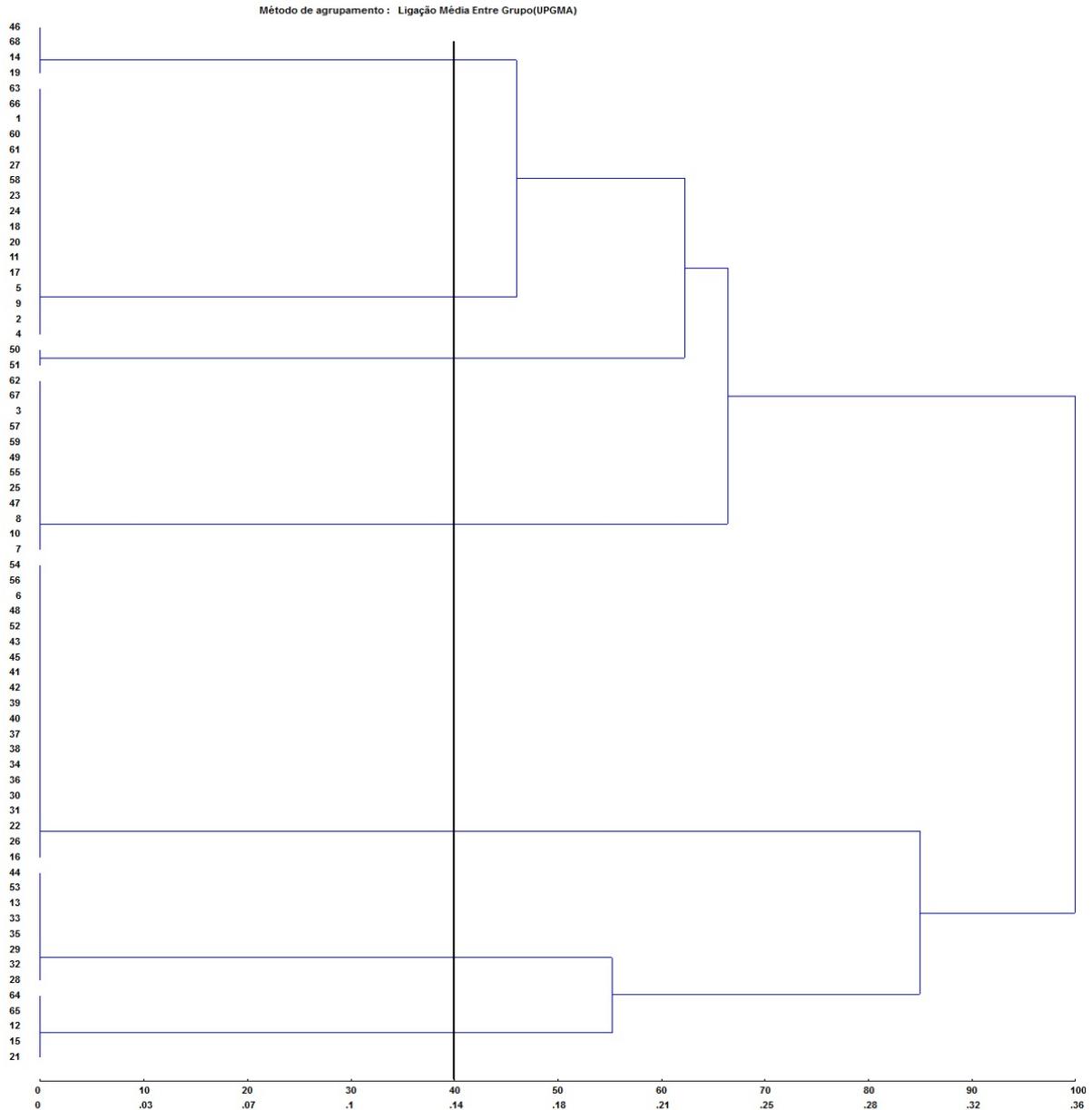
No caso do genótipo CNPA-SH 68, onde foram encontrados rudimentos foliares na parte abaxial das folhas, e também a marca molecular associada aos genótipos de frutos indeiscentes, provavelmente o grupo é constituído por genótipos também indeiscentes ou semideiscentes.

**Tabela 2:** Agrupamento dos 68 genótipos de Gergelim pelo método de otimização de Tocher, a partir de dados de marcadores RAPD.

GRUPO	GENÓTIPOS DE GERGELIM
A	1, 2, 4, 5, 9, 11, 17, 18, 20, 23, 24, 27, 58, 60, 61, 63 e 66
B	3,7, 8, 10, 25, 47, 49, 55, 57, 59,62 e 67
C	6, 16, 22, 26, 30, 31, 34, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 45, 48, 52, 54 e 56
D	12, 15, 21, 64 e 65
E	13, 28, 29, 32, 33, 35 e 44
F	14, 19, 46 e 68
G	50 e 51

- **Método hierárquico – UPGMA**

Pelo resultado da hierarquização dos genótipos pelos métodos do UPGMA (Figura 7), constatou-se que, ao se adotar um percentual de divergência genética em torno de 40%, o qual corresponde à distância genética de 0,14, há a formação de sete diferentes agrupamentos heteróticos, ratificando o agrupamento do método de otimização de Tocher, onde, os genótipos CNPA-SH 14, CNPA-SH 19, CNPA-SH 46 e CNPA-SH 68, foram reunidos no mesmo grupo, e os genótipos CNPA-SH 50 e o CNPA-SH 51 foram os mais divergentes.

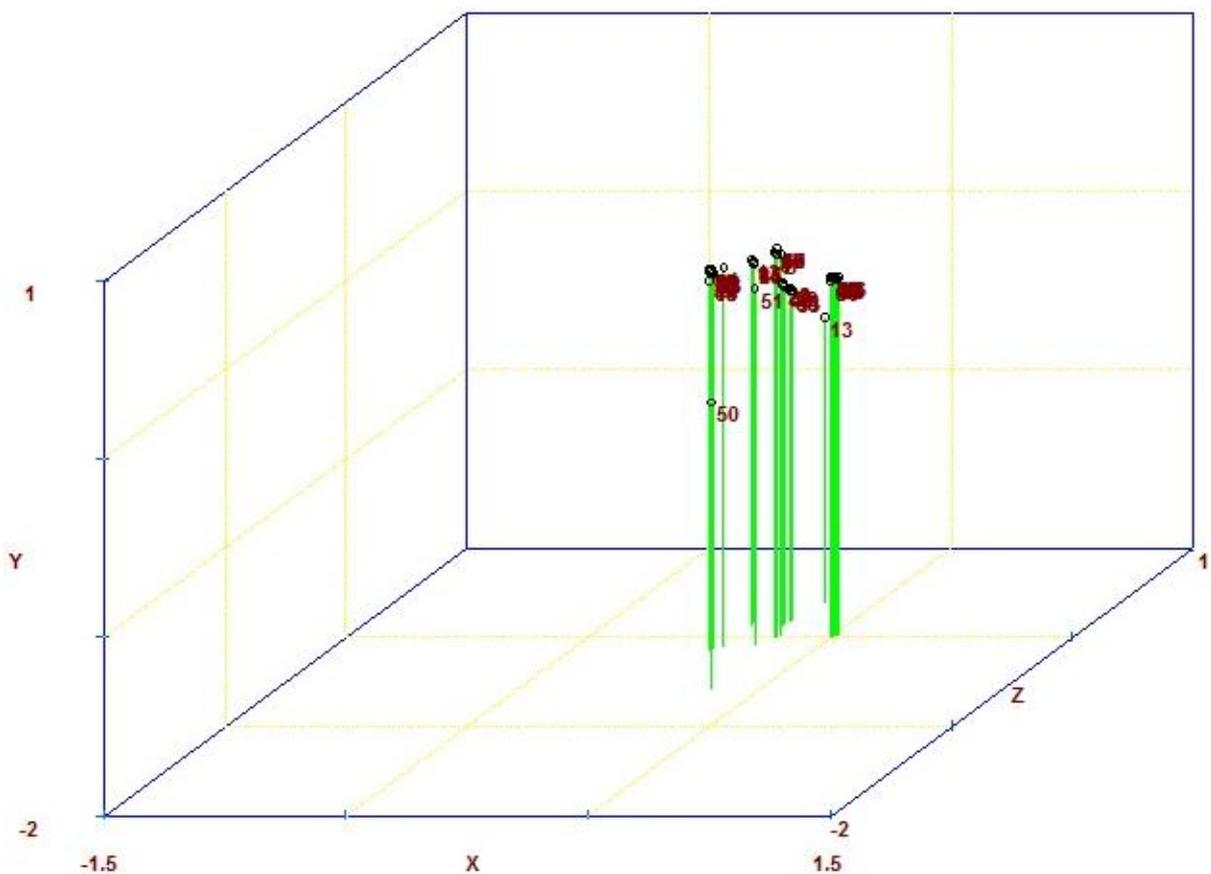


**Figura 7.** Dendrograma do agrupamento UPGMA construído a partir do complemento aritmético do Coeficiente de Jaccard entre 68 genótipos de Gergelim, considerando os marcadores RAPD (Foto: Programa *Genes*).

As estimativas médias das distâncias genéticas entre os genótipos obtidas a partir do coeficiente de Jaccard variaram, aproximadamente, de 0,03 a 0,67 refletindo uma baixa diversidade genética entre os 68 genótipos avaliados. No entanto, os marcadores RAPD possibilitaram a caracterização da diversidade entre os genótipos de gergelim estudados observando-se grupos bastante similares e grupos heteróticos, tais resultados corroboram com os obtidos por Ercan et al. (2004) e Bhat et al. (2006) que, também a partir de marcadores RAPD, detectaram polimorfismo em germoplasma de gergelim.

- **Dispersão gráfica**

Na representação gráfica das estimativas de distância num plano tridimensional (Figura 8) constata-se principalmente a maior divergência dos genótipos CNPA-SH 13, CNPA-SH 50 e CNPA-SH 51.



**Figura 8.** Projeção gráfica das estimativas de distâncias de dissimilaridade de 68 genótipos de Gergelim a partir de marcadores RAPD (Foto: Programa *Genes*).

Constatou-se que os diferentes métodos de agrupamento a partir de marcadores RAPD destacaram os genótipos CNPA-SH 14, CNPA-SH 19, CNPA-SH 46, CNPA-SH 50, CNPA-SH 51 e CNPA-SH 68, como mais divergentes e com a presença da banda associada à indeiscência dos frutos.

### 5.1.2 Análise do marcador microssatélite

Foram utilizados nove *primers*, selecionados por apresentarem quantidade, qualidade e reprodutibilidade de bandas amplificadas, sendo gerado um total de 132 alelos. O número de marcas produzidas por iniciador variou de 1 (primer 3) a 16 (primer 9). O tamanho dos fragmentos amplificados variou de aproximadamente 250 a cerca de 350 pares de base.

- **Método de agrupamento – Tocher**

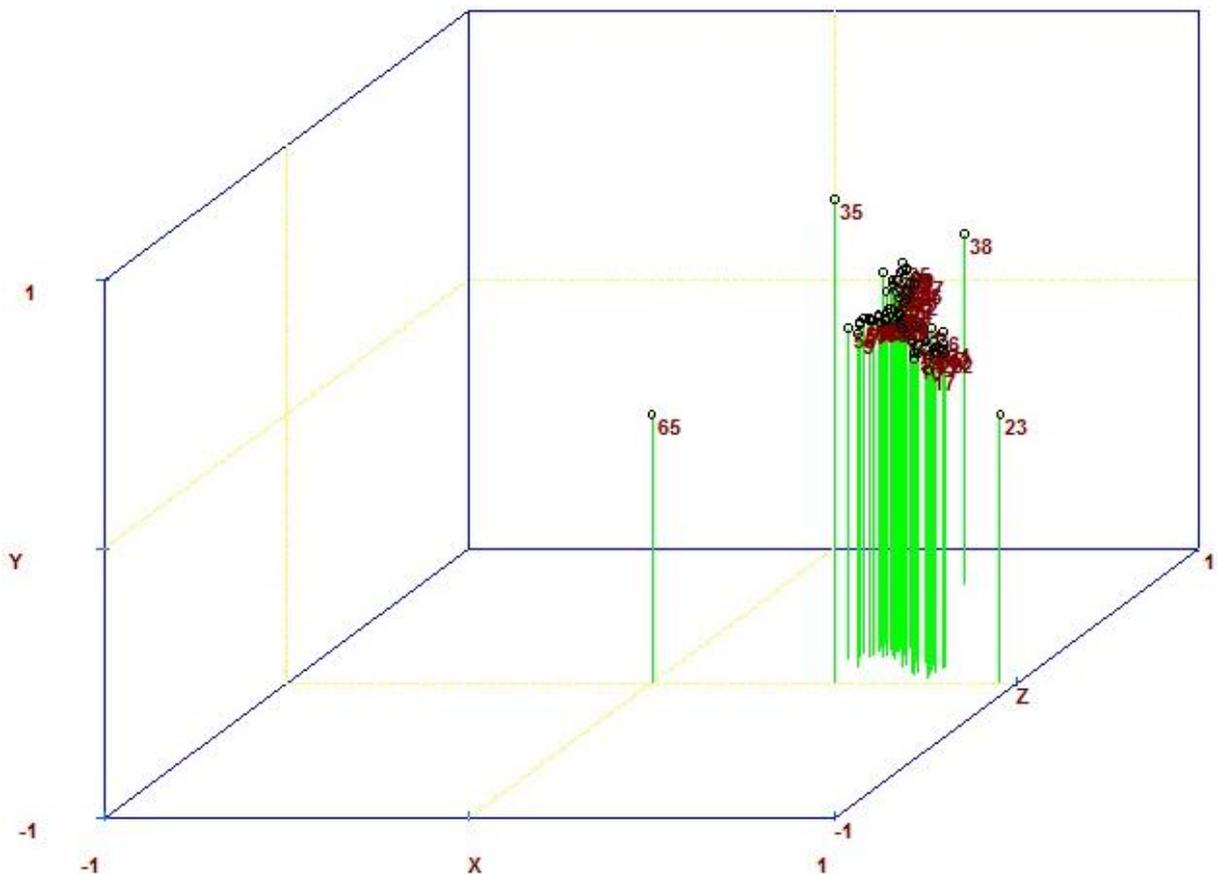
Com o agrupamento pelo método de otimização de Tocher (Tabela 3), identificou-se a formação de nove grupos. O Grupo D, formado pelos pares de genótipos CNPA-SH 42 e o CNPA-SH 45, os pares CNPA-SH 24 e CNPA-SH 36 foram agrupados no Grupo E. Observa-se ainda a formação de quatro grupos unitários representado pelos genótipos CNPA-SH 38 (Grupo F), CNPA-SH 40 (Grupo G), CNPA-SH 35 (Grupo H), CNPA-SH 65 (Grupo I).

**Tabela 3:** Agrupamento dos 68 genótipos de Gergelim pelo método de otimização de Tocher, a partir de dados de marcadores microssatélite.

GRUPO	GENÓTIPOS DE GERGELIM
A	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 25, 37, 44 e 46
B	47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 66, 67 e 68
C	26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 39, 41 e 43
D	42 e 45
E	24 e 36
F	38
G	40
H	35
I	65

- **Dispersão gráfica**

Na representação gráfica das estimativas de distância num plano tridimensional (Figura 9) constatou-se principalmente a maior divergência dos genótipos CNPA-SH 23, CNPA-SH 35, CNPA-SH 38 e CNPA-SH 65. Com exceção do genótipo CNPA-SH 23 os demais apresentaram divergência semelhante ao resultado obtido com o agrupamento de Tocher.



**Figura 9.** Projeção gráfica das estimativas de distâncias de dissimilaridade de 68 genótipos de Gergelim a partir de marcadores microsatélite (Foto: Programa *Genes*).

A partir dos resultados obtidos pelos métodos de agrupamento Tocher e dispersão gráfica, constatou-se que os genótipos CNPA-SH 24, CNPA-SH 35, CNPA-SH 36, CNPA-SH 38, CNPA-SH 40, CNPA-SH 42 e o CNPA-SH 45, apresentaram-se como os mais divergentes.

## 6. CONCLUSÕES

A partir dos marcadores moleculares constatou-se baixa divergência genética entre os genótipos de gergelim estudados.

A caracterização por meio dos marcadores RAPD, identificou genótipos bastante similares. A maior divergência foi observada nos genótipos CNPA-SH 14, CNPA-SH 19, CNPA-SH 46, CNPA-SH 50, CNPA-SH 51 e CNPA-SH 68, em relação aos demais.

Dentre os genótipos analisados o CNPA-SH 68 apresentou marcas RAPD em associação a características fenotípica de indeiscência dos frutos.

A caracterização por meio dos marcadores microssatélites identificou grupos de alta similaridade genética e genótipos divergentes: CNPA-SH 24, CNPA-SH 35, CNPA-SH 36, CNPA-SH 38, CNPA-SH 40, CNPA-SH 42 e CNPA-SH 45.

## 7. REFERÊNCIAS

ALZATE-MARIN, A.L., CERVIGNI, G.D.L., MOREIRA, M.A. & BARROS, E.G. Seleção assistida por marcadores moleculares visando ao desenvolvimento de plantas resistentes a doenças, com ênfase em feijoeiro e soja. **Fitopatologia Brasileira** 30:333-342, 2005.

ARRIEL, N. H. C. **Diversidade genética em gergelim (*Sesamum indicum* L.) a partir de marcadores moleculares (RAPD) e caracteres morfológicos e agronômicos**. 2004. 114 f. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal.

ARRIEL, N. H. C.; FIRMINO, P. de T.; BELTRÃO, N. E. de M.; SOARES, J. J.; ARAÚJO, A E.; SILVA, A C.; FERREIRA, G. B. **A cultura do gergelim**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2007. 72p. (Cartilha Plantar, 50).

BARROS, M. A.; SANTOS, R. F.; BENATI, T.; FIRMINO, P. T. Importância econômica e social. In: BELTRÃO, N. E. M.; VIEIRA, D. J. **O Agronegócio do gergelim no Brasil**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2001, p. 21-35.

BATISTA, Carlos Eduardo Araújo; ARAÚJO, Rafaela L.; HOFMANN, Lúcia Vieira; MORESCO, Edina; BARROSO, Paulo Augusto Vianna. Uso de esferas de inox na maceração de tecidos foliares de algodoeiro destinados a purificação de DNA. In: V CONGRESSO BRASILEIRO DE ALGODÃO, 2005, Salvador. **Anais...** Contacti, 2005. 1 CD-ROM.

BELTRÃO, N.E, de M. Origem e história. In: BELTRÃO, N. E. M.; VIEIRA, D. J. **O Agronegócio do gergelim no Brasil**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2001, p. 17-20.

BELTRÃO, N.E, de M.; FREIRE, E. C.; LIMA, E. F. **Gergelim cultura no trópico semi-árido nordestino**. Campina Grande: EMBRAPA-CNPA, 1994. 52p. (EMBRAPA-CNPA. Circular Técnica, 18).

BELTRÃO, N. E. de M. **Importância da cultura do gergelim para região Nordeste**. CNPA Informa. Gergelim nova alternativa para o semi-árido nordestino. n. 19, p.5, dez. 1995.

BELTRÃO, N. E. de M.; VALE, L.; SILVA, O R. F. de. Grãos Oleaginosos. In: ALBUQUERQUE, A C. S.; SILVA, A G. da (Eds.). **Agricultura tropical: quatro décadas de inovações tecnológicas, institucionais e políticas (Parte 8. Agroenergia)**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, cap. 4, 2008. p. 753-766.

BHAT, K.V; BABREKAR, P.P; LAKHANPAUL, S. Study of genetic diversity in Indian and exotic sesame (*Sesamum indicum* L.) germplasm using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. **Euphytica**, v.110, n.1, p.21-34, 2006.

CRESTE, S.; TULMANN NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology Reporter**, Athens, v.19, p.299-306, 2001.

CRUZ, C.D.; CARNEIRO, P.C.S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. v.2, Viçosa: UFV, Imprensa Universitária, 2003, 585p.

CRUZ, C. D. **Programa GENES: Biometria: Versão windows: aplicativo computacional em genética e estatística**. Viçosa: UFV, 2008.

CRUZ, C.D.; REGAZZI, A.J. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa: UFV, Imp. Univ., 1994. 390p.

DINIZ, A. L. **Caracterização da diversidade de gergelim por marcadores RAPD**. 2008. 35f. Trabalho de Conclusão de Curso (Monografia) – Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande.

DIAS, L.A.S. Análises multidimensionais. In: ALFENAS A.C. **Eletroforese de Isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microorganismos**. Viçosa: UFV, 1998, p.405-475.

DIXIT, A., JIN, M.H., CHUNG, J.W., YU, J.W., CHUNG, H.K., MA, K.H., PARK, Y.J. & CHO, E.G. Development of polymorphic microsatellite markers in sesame (*Sesamum indicum* L.). **Molecular Ecology Notes** 5(4), 2005. 736-738.

ERCAN A.G.; TASKIN M.; TURGUT K. Analysis of genetic diversity in Turkish sesame (*Sesamum indicum* L.) populations using RAPD markers. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v51, n° 6, p. 599-607, 2004.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. Statistical Data. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/faostat>> Acesso em 07 de maio de 2012.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3.ed. Brasília: EMBRAPA, CENARGEN, 1998, 220p.

FIRMINO, P. de T. **Gergelim: Sistemas de produção e seu processo de verticalização, visando produtividade no campo e melhoria da qualidade da alimentação humana**. Campina Grande, Embrapa-CNPQ, 1996. p. 65.

GUPTA, P. K.; VARSHNEY, R. K. The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with emphasis on bread wheat. **Euphytica** v. 113, p. 163-185, 2000.

LANGHAM, D. R.; WIEMERS, T. Progress in mechanizing sesame in US through breeding In.: JANICK, J.; WHIPCKEY, A. (eds) **Trends in new crops and new uses**. Alexandria, ASHS Press, 2002. p. 157-173.

Levantamento Sistemático da Produção Agrícola, Rio de Janeiro: IBGE/CPAGRO, abr. 1997.

KANTETY, R.V.; ROTA, M. L.; MATTHEWS, D. E.; SORRELLS, M. E. Data mining for simple sequence repeats in expressed sequence tags from barely, maize, rice, sorghum and wheat. **Plant Molecular Biology, Dordrecht**, v. 48, p. 501-510, 2002.

MAZZANI, B. **Cultivo y mejoramiento de plantas oleaginosas**. Caracas:[s.n], 1983. p.169-226.

MELO, W.M.C., PINHO, R.G.V.; SANTOS, J.B.; FERREIRA, D.F. Utilização de caracteres morfoagronômicos e marcadores moleculares para a avaliação da divergência genética entre híbridos de milho. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 48, n. 276, p. 195-207, 2001.

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 acaizeiro por marcadores moleculares RAPD e SSR. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, n. 02, p. 438-443, 2008.

PAHAM, T. D. **Analyses of Genetic Diversity and Desirable Traits in Sesame (*Sesamum indicum* L., Pedaliaceae): Implication for Breeding and Conservation**. 2011. 52 f. Doctoral Thesis– Faculty of Landscape Planning, Horticulture and Agricultural Sciences Department of Plant Breeding and Biotechnology Alnarp.

PIGATO, S.M.P.C.; LOPES, C.R. Caracterização silvicultural, botânica e avaliação da variabilidade genética por meio do marcador molecular RAPD em um teste de progênies de *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake. **SCIENTIA FORESTALIS**, n. 60, p. 135-148, dez. 2001.

POWELL, W.; MACHRAY, G. C.; PROVAN, J. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. **Trends Plant Science**, v.1, p.215-222, 1996.

SABATINI, G. **Técnicas moleculares no diagnóstico da resistência**. *Biológico*. v. 65, n. 1, p. 29-32, 2003.

SIMKO, I. Development of EST-SSR markers for the study of population structure in lettuce (*Lactuca sativa* L.). **Journal of Heredity**, v. 100, p. 256-262, 2008.

SINGH, D.; UNREA, A.C. Inter and intraracial hibridization and selection for seed yeld in early generations of commom bean, *Phaseolus vulgaris* L. **Euphytica**, Wageningen, v.81, n.21, p.131-137, 1995.

SILVA, L.C. **Cultura do gergelim**. Campina Grande: EMBRAPA-CNPA,1993. 15p (Treinamento para assistentes de pesquisa do sistema cooperativo de pesquisa agropecuária. Campina Grande, PB, ago., 1993).

TAUTZ, D.; RENZ, M. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. **Nucleic Acids Research**, v. 12, p. 4127-4138, 1984.

VIDAL, Márcia Soares; COUTINHO, Taciana de Carvalho; HOFFMANN, Lúcia Vieira. **Comparação entre protocolos de extração de DNA de algodão para emprego em ensaios com marcadores moleculares**. Campina Grande: Embrapa Algodão, nov. 2003. (Circular Técnica 74.)

YERMANOS, D.M. Sesame. In: FHER, W.R.; HADDEY, H.H. **Hybridization of crop plants**. Madison, Wisc.: ECS, 1980. p.549-563.

WILLIAMS, J.G.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A.; TINJEY, S.V. DNA polymorfism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, London, v. 18, p. 6531-6536, 1990.