

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

ESTUDOS DA DIVERSIDADE GENÉTICA EM GENGIBRE VIA MARCADORES MOLECULARES

Naythre Ananias Nunes, Thárssyla Simão de Carvalho Souza, José Dias de Souza Neto, Monique Moreira Moulin, Larissa de Carvalho Nascimento Nunes, Ana Paula Candido Berilli.

Instituto Federal do Espírito Santo – Campus de Alegre, km 47, Rodovia BR-482 – Cachoeiro de Itapemirim, distrito de Rive – ES, naythreanaciasnunes@gmail.com; tharssyllac@gmail.com; jose.neto@ifes.edu.br; mmmoulin@ifes.edu.br; larissa.carvalho@ifes.edu.br; ana.berilli@ifes.edu.br.

Resumo

O gengibre, apesar de ser uma planta de origem asiática, adaptou-se muito bem às condições de clima e solo brasileiro, e o estado do Espírito Santo é o maior produtor e exportador brasileiro desta cultura. Para melhor caracterização dos materiais genéticos que formam as lavouras capixabas, este trabalho apresenta como objetivo avaliar a diversidade genética de gengibre com base em marcadores moleculares para melhor direcionar os trabalhos que serão desenvolvidos no pré-melhoramento desta cultura. Para tanto, 15 acessos de gengibre tiveram suas folhas coletadas em diferentes propriedades rurais e foram preparados para as análises moleculares com marcadores do tipo ISSR. A princípio foram avaliados oito primers não específicos para gengibre que geraram 94 marcas polimórficas. Com base na análise dos géis de agarose, após as reações de polimerase em cadeia, observou-se com base no dendrograma que o acesso 15 foi o portador de maior dissimilaridade enquanto 5 e 9 foram os que mais se assemelhavam. O primer UBC – 842, foi o mais eficiente em obter maior número de marcas polimórficas.

Palavras-chave: *Zingiber officinale* Roscoe. Diversidade Genética. Pré-melhoramento

Área do Conhecimento: Ciências Biológicas

Introdução

O gengibre foi informado descritivamente na literatura pela primeira vez pelo botânico britânico William Roscoe, sendo atualmente a região Indo-Malaia a mais rica em diversidade de gengibre e inclui mais de 1200 espécies de plantas com 53 gêneros e cerca de 85 espécies, (FOSTER, 2002). Apesar de ser uma planta nativa da Ásia, pertencente à família Zingiberaceae, tal cultura se adaptou muito bem ao clima brasileiro (CHAVES *et al.*, 2012). O rizoma desta espécie é utilizado como condimento e matéria-prima para a fabricação de bebidas, temperos, doces e geleias e também muito empregado para fins medicinais (JIANG *et al.*, 2007). As atividades antioxidantes e anti-inflamatórias, bem como as funções hepatoprotetoras, estão associadas à presença de várias substâncias, como gingerol, canfeno, salsa e zingerona (YU *et al.*, 2007).

No Brasil, o Espírito Santo é o maior produtor de gengibre, sendo uma boa opção de renda para os produtores de base familiar, o gengibre vem tendo um aumento na produção capixaba, sendo aproximadamente 51,6% na classificação de plantações em ascensão do estado comparado a anos anteriores superando o aumento do café em 20,2% e o de abacate 30,1% enquanto na categoria da olericultura o gengibre capixaba foi estimado em uma produção de aproximadamente 54.800 toneladas em 967 ha de colheita gerando uma renda de aproximadamente 172.667 mil reais e uma participação de 1% dos 8,93% dos dados da olericultura no estado, ficando atrás somente do tomate (2,08%) e repolho (1,08%) com base nos dados da Incaper por Vinagre *et al.* (2022).

Embora sua importância econômica e social seja expressiva, pouco se sabe sobre o material genético cultivado nas lavouras capixabas, neste sentido, propõem-se a estratégia do pré-melhoramento genética de gengibre, o que refere-se às atividades realizadas visando conhecer os acessos antes de introduzi-los em um programa de melhoramento, desta forma, o pré-melhoramento desta cultura torna-se fundamental para o conhecimento dos acessos a serem trabalhados, permite a seleção de plantas superiores, além de permitir a construção de um banco de germoplasma para preservação genética desses materiais.

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

Para potencializar as ações do pré-melhoramento genético são empregados os Marcadores moleculares, os quais vêm sendo amplamente utilizados para estudos de diversidade genética devido à sua utilidade como uma estratégia para detectar a variação do genoma, empoderando a análise genética vegetal (GEORGE *et al*, 2022). Entre os marcadores moleculares, o ISSR (Inter Single Sequence Repeats), utilizado na metodologia de Zietkiewicz *et al* (1999) com base em marcadores microssatélites (SSRs) se destacam, pois esses marcadores ISSR utilizam um único primer, geralmente constituído por uma sequência de microssatélites de 16-25 pb, para aumentar a qualidade principalmente de sequências Inter-SSR de diferentes tamanhos verificadas por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) que pode ser vista em trabalhos como Fontes *et al* (2012), Subositi *et al* (2022), Cardoso *et al* (2022), Sarker *et al* (2023).

Metodologia

O seguinte procedimento foi realizado no laboratório de genética e biologia molecular do IFES Campus de Alegre através do protocolo “mini-prep” de Doyle e Doyle (1990) com modificações propostas por Berilli *et al* (2013), 200 mg de tecido vegetal das folhas de gengibre foram macerados com nitrogênio líquido, posteriormente foram transferidos para tubos de eppendorf, tal processo foi realizado com todas as 15 amostras utilizadas na pesquisa sendo 14 delas obtidas do rizoma de cultivares de gengibre na cidade de Santa Leopoldina e uma delas obtida em mercado local. Após a maceração foi adicionado 800µl do tampão de extração pré-aquecido contendo 1% CTAB, 1,4M NaCl, 20 mM EDTA, 100mM Tris-HCl (Ph 8,0), 1% PVP e 0,1% 2-mercaptoethanol, invertendo-os manualmente por 5 minutos a fim de homogeneizá-los e incubando-se a 65°C por 30 a 40 minutos em banho maria, com agitação manual suave em um de intervalo de 10 minutos. Em seguida foi centrifugado a 14000 rpm por 5 minutos. Após tal processo o sobrenadante de aproximadamente 600µl foi transferido para novos tubos de eppendorf e a mesma quantidade de volume, 600uL de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) foi adicionado. Foi realizada uma nova centrifugação de 14000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para novos tubos e então isopropanol gelado a 70% foi adicionado, com suave inversão e submetido a “overnight” em geladeira (4°C). Realizou-se centrifugação a 14000 rpm por 10 minutos, obtendo-se um “pellet”, que foi lavado duas vezes, primeiramente com 300µl de etanol 70%, logo após, lavou-se também com 300µl de etanol 95%, o “pellet” foi ressuspenso em 200µl de solução Tris-EDTA (10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8,0) e incubado em banho maria com RNase na concentração final de 40 µg/ml a 37°C por 30 minutos. As concentrações de DNA nas amostras foram estimadas por meio de gel de poli(acrilamida) a 10% e padronizadas na concentração de 10ng.µl⁻¹.

As reações de amplificação via PCR foram feitas conforme Zietkiewicz *et al*, (1994) através de modificações propostas por Berilli *et al* (2013), num volume final de 15 µl contendo os reagentes nas seguintes concentrações para uma reação de PCR via marcadores moleculares ISSR: 1,5 µL de Tampão 10X (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl pH 8,4, 1% de Triton X-100), 0,6 µL de 25 mM MgCl₂, 4,8 µL de 0,2 mM dNTPs, 0,3 µL de 0,5 mM de primer 0,2µL de Taq DNA polimerase a 5U/µL e 3µL de DNA genômico a 10 ng/UL, completando o volume final com água ultrapura, que neste caso foi 4,6µL. Um controle negativo com omissão de DNA foi incluído em cada corrida para verificar a ausência de contaminação, sendo o volume do DNA substituído por igual volume de água ultrapura.

O número de polimorfismo pode ser classificado de acordo com os primers que amplificam fragmentos a fim de que seja possível analisar sua diversidade e semelhança, neste estudo foram utilizados os primers microssatélites ISSR sendo eles selecionados através de uma triagem com 32 primers, duas amostras de DNA e um controle negativo a fim de detectar quais primers iriam detectar mais marcas polimórficas. Após tal processo seis primers foram escolhidos para o presente estudo, sendo eles os primers ISSR 5, ISSR 3, LOL 1, UBC 818, UBC 842, ISSR 17, ISSR 19, ISSR 20.

As reações de amplificação foram realizadas no termociclador gradiente Eppendorf com as configurações para o programa ISSR: Ciclo de desnaturação inicial a 94 °C por 5 minutos, seguido de 40 ciclos de amplificação de 94° por 30 segundos (desnaturação), 52 °C por 40 segundos (anelamento), 72 °C por 1 minuto (extensão), e após tais repetições, 72 °C por 5 minutos e posteriormente se mantém a 25°C.

O material genético foi corado com 3uL de corante ‘blue juice’ 6X (0,4 ml TAE 10X, 0,5 M; 0,2 ml SDS 10%; 0,2 ml de azul de bromofenol; 7,0 ml de glicerol; 1,7 ml de água estéril) e aproximadamente

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

6 µL de amostra foram aplicadas juntamente com o marcador Ladder de 100 pares de bases, na etapa de eletroforese a qual foi realizada através do gel de poliacrilamida a 7% e tampão TAE 10X, a 220 volts por 2 horas e 30 minutos. Posteriormente submetido ao brometo de etídio durante 30 minutos a fim de submeter a amostra ao aparelho de foto imagem (Bio Rad) que permitiu a análise e visualização de suas bandas de DNA.

A análise genética foi realizada através do índice Aritmético de Jaccard.

O índice é definido pela fórmula: $C_{ij} = 1 - \frac{a}{a} + b + c$

No qual a = 1 - 1: número de coincidência do tipo 1 e 1; b = 1 - 0: número de discordância do tipo 1 e 0; c = 0 - 1: número de discordância do tipo 0 e "1". Sendo; 1 presença de banda e 0 a ausência de banda.

Após a tabulação dos dados os procedimentos foram analisados no programa Genes com a complementação do Método de Otimização de Tocher o qual avalia a média de dissimilaridade entre os indivíduos e também com a utilização dos Métodos Hierárquicos que agrupam os genótipos em grupos a fim de gerar um dendrograma com ramificações que associam suas similaridades genéticas com ajuda do método de agrupamento UPGMA. (Cruz; 2016)

Resultados

Foram testados oito primers em 15 acessos de gengibre (Quadro 1), apresentando amplificações para estes acessos um total de 94 bandas polimórficas. Os primers ISSR 5, ISSR 3 e LOL 1, analisados segundo Métais *et al* (2000) e utilizados por Neto *et al* (2011), Le Clerc *et al* (2014), Eschenbrenner *et al* (2019), Silva (2022) enquanto UBC 818 e UBC 842 estão presente no trabalho de Santos *et al* (2013), já o ISSR 17, ISSR 19 e ISSR 20 são encontrados na literatura nos trabalhos de Khadke *et al* (2015), El Kharrassi *et al* (2017) e Farooq *et al* (2014) respectivamente.

Quadro 1 - Sequência dos primers e número de marcas polimórficas utilizadas na caracterização da diversidade genética de gengibre.

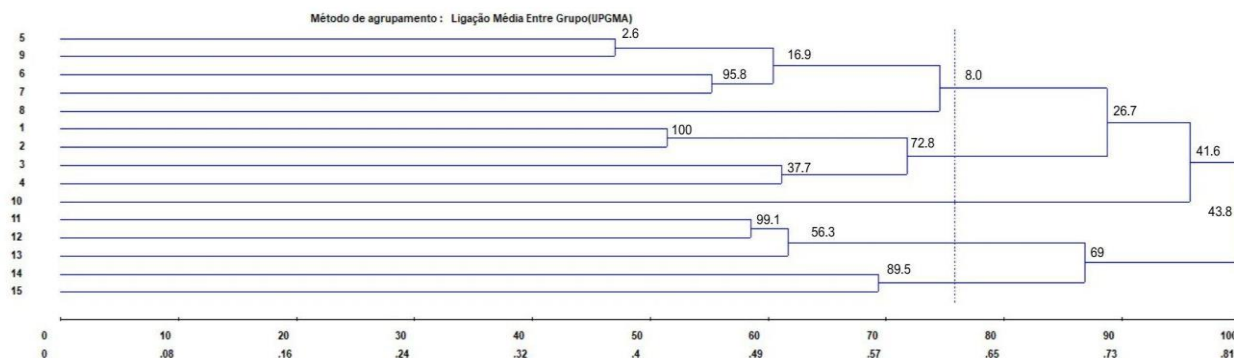
Primers	Sequência	Bandas polimórficas
ISSR 5	VHVCTCTCTCTCTCTCTCT	8
ISSR 3	ACTGACTGACTGACTG	11
LOL 1	CTCTCTCTCTCTCTCTAC	11
UBC 818	CACACACACACACACAG	10
UBC 842	GAGAGAGAGAGAGAGAYG	15
ISSR 17	CTCTCTCTCTCTCTTTG	6
ISSR 19	TCCTCCTCCTCCTCCAG	13
ISSR 20	AGCAGCAGCAGCCT	13

Fonte: os autores, 2023.

Dos oito primers utilizados para as análises moleculares, vemos que o UBC 842, o ISSR 19 e o ISSR 20 foram os que apresentaram os maiores números de bandas polimórficas (Tabela 1). A partir das 94 bandas polimórficas geradas pelos oito marcadores, conseguimos acessar a matriz de dissimilaridade das distâncias genéticas estimadas para os acessos, bem como o número de grupos formados, o dendrograma das distâncias (Figura 1), a confiabilidade dos ramos do dendrograma (Figura 1) e o valor de correlação cofenético da matriz de distância com a do dendrograma.

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

Figura 1. Dendrograma formulado a partir do índice de Jaccard



Fonte: Próprios autores (2023)

Através do método de Tocher foram formados cinco grupos sendo o primeiro composto pelos indivíduos 5, 9, 6, 7, 4, 8, 3 e 2; o segundo por 11, 12, 13; o terceiro por 14, 15; o quarto grupo contendo apenas o indivíduo 1 e o quinto possuindo apenas o indivíduo 10. Pode-se observar no dendrograma que o indivíduo 15 foi o portador de maior dissimilaridade enquanto 5 e 9 foram os que mais se assemelharam.

A esquerda do dendrograma estão representados os 15 genótipos de gengibre, enquanto na linha abaixo há a distância em porcentagem que foi definida pelo método de Tocher, enquanto as bifurcações possuem a porcentagem de confiabilidade das dissimilaridades produzidas através do método de Bootstrap. O valor da correlação cofenética a qual possui um valor total de 80,3%, que pode ser considerado bom, visto que quanto mais próximo de 100% melhor é o resultado segundo Rohlf (2001).

Os genótipos mais próximos geneticamente foram os representados por 5 e 9 do grupo 1 que se encontram aproximadamente na bifurcação mais curta, sendo seguidos pelos indivíduos 6, 7, 8 os quais são consequentemente os mais próximos geneticamente, enquanto o segundo grupo, com os componentes 11, 12 e 13 e o terceiro grupo com 14 e 15 se encontraram em uma bifurcação muito maior e mais próxima da distância máxima da figura 1, ultrapassando a medida de 90% de distância.

Discussão

Dos primers testados, temos o ISSR 5, ISSR 3 e LOL 1 utilizados por Métails *et al* (2000), Neto *et al* (2011), Le Clerc *et al* (2014), Eschenbrenner *et al* (2019), Silva (2022) para as espécies de feijão (*Phaseolus vulgaris* L), cerefólio (*Chaerophyllum bulbosum*), orvalhinha (*Drosera rotundifolia*) e feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp), também mostraram grande número de bandas polimórficas. Já os primers UBC 818 e UBC 842 foram trabalhados por Santos *et al* (2013) para amendoim (*Arachis hypogaea* L.) Khadke (2015), El Kharrassi (2017) e Farooq (2014) trabalharam com os primers ISSR 17, ISSR 19 e ISSR 20 respectivamente para as espécies betel (*Piper betle* L.), opúncia (*Opuntia spp.*) e hipericão (*Hypericum perforatum* L.).

A formação de 94 marcas polimórficas foi obtida utilizando oito primers do tipo ISSR confirmando seu alto potencial polimórfico que em comparação ao RAPD e ao SSR é o mais eficaz para cultivares de gengibre segundo Ismail *et al* (2016) com base na análise de trabalhos anteriores. Tais fatores de dissimilaridade são utilizados para o selecionamento de plantas com melhor potencial genético para programas de melhoramento genético visto que tal análise é mais consistente visto que aquele que sofre menor alteração ambiental é o complemento genético da herdabilidade de um caráter fenótipo. (Ismail *et al* 2019).

A distância de dissimilaridade dos genótipos começou a ocorrer principalmente após 50% de distância conforme apresentado na figura 1, valor semelhante ao encontrado por Pandotra *et al* (2013) para gengibre. A topologia do dendrograma do nosso trabalho difere dos encontrados em outras culturas, como feijão, nos trabalhos de La Rosa *et al* (2021) e Cabral *et al* (2011). Uma provável explicação é de que o gengibre possui uma base genética menos estreita do que outras espécies cultivadas, o que é refletido na topologia do dendrograma e na porcentagem do início das bifurcações.

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

Quanto mais divergentes os indivíduos são geneticamente uns dos outros, melhor eles podem ser usados para cruzamentos formando híbridos, e quanto mais próximos, que é o caso dos indivíduos 5 e 9, em um cruzamento favorecerá a endogamia (SILVA; 2022).

A diversidade genética entre os indivíduos é de extrema importância para que seja possível analisar os genótipos existentes e buscar sua preservação visto que tal material pode ser perdido através de barreiras geográficas ou temporárias e é importante citar que para promover maiores informações a respeito da diversidade dos indivíduos estudos faz se necessário o uso de mais primers a fim de encontrar um maior número de marcas (CABRAL; 2011).

Conclusão

Pode-se concluir que os indivíduos 5 e 9 são os que mais se assemelham entre os demais indivíduos e o indivíduo 15 aquele que possui maior diferença genética. O primer UBC 842, foi o que gerou maiores números de marcas polimórficas dentre os primers utilizados. Estudar a diversidade genética é fundamental para além de aprendizagem, proporcionar benefícios e ganhos genéticos para programas de melhoramento.

Referências

BERILLI, A. P. C. G. et al. Response to the selection in the 11th cycle of reciprocal recurrent selection among full-sib families of maize. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 35, p. 435-441, 2013.

BRESEGHELLO, F.; MORAIS, O. P.; RANGEL, P. H. N. A new method to estimate genetic gain in annual crops. **Genetics and Molecular Biology**, v. 21, p. 551-555, 1998.

CABRAL, P. D. S. et al. Diversidade genética de acessos de feijão comum por caracteres agrônomicos. **Revista Ciência Agronômica**, v. 42, p. 898-905, 2011.

CARDOSO, A. N. G. Conservação, **propagação in vitro e avaliação de marcadores moleculares para a caracterização genética de germoplasma de Cydonia oblonga Mill.** Tese de Doutorado. Universidade de Coimbra. 2022.

CHAVES, E. M. F.; BARROS, R. F. M. Diversidade e uso de recursos medicinais do carrasco na APA da Serra da Ibiapaba, Piauí, Nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 14, p. 476-486, 2012.

CONSTABLE, E. C.; WARD, M. D.; TOCHER, D. A. Spontaneous assembly of a double-helical binuclear complex of 2, 2': 6", 2": 6", 2": 6", 2": 6", 2": 6", 2": 6"-sexipyridine. **Journal of the American Chemical Society**, v. 112, n. 3, p. 1256-1258, 1990.

CRUZ, C. D. Genes Software-extended and integrated with the R, Matlab and Selegen. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 38, p. 547-552, 2016.

EL KHARRASSI, Y. et al. Characterization of genetic diversity of cactus species (*Opuntia* spp.) in Morocco by morphological traits and molecular markers. **Current Agriculture Research Journal**, v. 5, n. 2, p. 149-159, 2017.

ESCHENBRENNER, S., MÜLLER, C. M., GEMEINHOLZER, B., & WISSEMAN, V. Genetic diversity and implications for conservation strategies of *Drosera rotundifolia* L. (Droseraceae) in northern Germany (Schleswig-Holstein). **Mires and Peat**, 24(24), 12. 2019.

FAROOQ, S. et al. Genetic diversity analysis in the *Hypericum perforatum* populations in the Kashmir valley by using inter-simple sequence repeats (ISSR) markers. **African Journal of Biotechnology**, v. 13, n. 1, 2014.

FONTES, A. C. L. **Variabilidade genética e avaliação da inibição dos extratos de plantas medicinais sobre isolados de Fusarium oxysporum f. sp. phaseoli.** Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco. 2012.

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

GEORGE, N. M.; RAGHAV, S. B.; PRASATH, D. Direct in vitro regeneration of medicinally important Indian and exotic red-colored ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) And genetic fidelity assessment using ISSR and SSR markers. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 58, n. 4, p. 551-558, 2022.

HASEMAN, J. K.; ELSTON, R. C. The investigation of linkage between a quantitative trait and a marker locus. **Behavior genetics**, v. 2, n. 1, p. 3-19, 1972.

ISMAIL, N. A. et al. Genetic diversity of torch ginger (*Etlingera elatior*) germplasm revealed by ISSR and SSR markers. **BioMed research international**, v. 2019, 2019.

ISMAIL, N. A. et al. Molecular markers: a potential resource for ginger genetic diversity studies. **Molecular biology reports**, v. 43, p. 1347-1358, 2016.

KHADKE, G. N. et al. Inter simple sequence repeat (ISSR) markers as reproducible and specific tools for genetic diversity analysis of betelvine germplasm and Piper species. **Indian Journal of Horticulture**, v. 72, n. 2, p. 223-231, 2015.

LA ROSA, L. et al. Common vetch, valuable germplasm for resilient agriculture: genetic characterization and Spanish core collection development. **Frontiers in plant science**, v. 12, p. 617873, 2021.

LE CLERC, V., SUEL, A., GEOFFRIAU, E., HUET, S., & BRIARD, M. Évolution temporelle de la diversité génétique de *Chaerophyllum bulbosum*: conséquences sur la gestion des ressources génétiques. **Comptes Rendus Biologies**, 337(5), 352-359. 2014.

MÉTAIS, I., AUBRY, C., HAMON, B., JALOUZOT, R., & PELTIER, D. Description and analysis of genetic diversity between commercial bean lines (*Phaseolus vulgaris* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, 101, 1207-1214. 2000.

NETO, A. C. L. **Caracterização genética de espécies de Croton (Euphorbiaceae) ocorrentes no Nordeste Brasil**. Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2011.

PANDOTRA, Pankaj et al. Genetic and chemo-divergence in eighteen core collection of *Zingiber officinale* from North-West Himalayas. **Scientia Horticulturae**, v. 160, p. 283-291, 2013.

ROHLF, F. James. Comparative methods for the analysis of continuous variables: geometric interpretations. **Evolution**, v. 55, n. 11, p. 2143-2160, 2001.

SARKER, S. S. et al. Molecular identification and high fidelity micropropagation of shell ginger (*Alpinia zerumbet*). **All Life**, v. 16, n. 1, p. 2169960, 2023.

SILVA, L. C. D. **Avaliação da variabilidade genética dos genótipos do feijão caupi via marcadores moleculares ISSR**. Trabalho de conclusão de curso (Licenciatura em Ciências Biológicas) - IFES Campus de Alegre, alegre, 2022.

SUBOSITI, D. et al. Genetic Diversity and Chemicals Profile of Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) in Indonesia. **Int. J. Adv. Sci. Eng. Inf. Technol**, v. 12, n. 3, p. 929-936, 2022.

VINAGRE, D.; GALEANO, E. Valor bruto da produção agropecuária de 2021 e previsões de produção para 2022. **INCAPER**. v.1 n.1. 2022.

Agradecimentos

O grupo de pesquisa agradece o apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Espírito Santo (FAPES). Ao Instituto Federal do Espírito Santo Campus de Alegre (IFES), ao laboratório de genética e biologia molecular do Ifes campus Alegre e ao Projeto FortAC.