

DIVERSIDADE GENÉTICA DE GENÓTIPOS DE GENGIBRE (*ZINGIBER OFFICINALE ROSCOE*) NO ESPÍRITO SANTO VIA RAPD E ISSR

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

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

Resumo

O presente estudo analisou a diversidade genética de 15 genótipos de gengibre encontrados em propriedades rurais do Espírito Santo através de marcadores moleculares RAPD e ISSR. A extração das amostras foi realizada através do protocolo Doyle e Doyle, posteriormente submetidas a PCR e eletroforese. Foram utilizados 28 primers sendo oito primers ISSR e vinte RAPD. Os dados analisados destacaram melhores resultados para o ISSR 11 que obteve 39 marcas polimórficas e uma proximidade genética entre os indivíduos 1 e 2, enquanto o indivíduo 12 foi o portador de maior diferença entre os cultivares.

Palavras-chave: Genética. Marcadores Moleculares. Gengibre. Biologia Molecular.

Área do Conhecimento: Ciências Biológicas - Genética

Introdução

Dada a grande exportação de gengibre no Espírito Santo, visou-se identificar 15 genótipos de gengibre (*Zingiber Officinale Roscoe*) de agricultores no município de Santa Leopoldina. Destaca-se que a cultura é amplamente relevante pois o estado é o maior produtor nacional, com 1.279 estabelecimentos rurais e maior destaque quando comparada a produções de cebola e batata-inglesa. Os registros de produção se iniciaram em 2011 com aproximadamente 8,0 mil toneladas e atualmente com os registros de 2022 a produção está em aproximadamente 59,5 mil toneladas (Padovan *et al.*; 2024).

Apesar de seu destaque comercial no Espírito Santo o Registro Nacional de Cultivares (RNC) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), ainda não possuía nenhum registro do gengibre (*Zingiber Officinale Roscoe*) até o ano 2024, quando ocorreu o registro de cultivar para tal espécie. Tal registro só ocorreu devido ao conjunto de projetos que buscaram caracterizar tal cultivar, através de suas características genotípicas e fenotípicas. Tais ferramentas de caracterização visam identificar a diversidade genética, auxiliando em projetos para melhoramento genético, bancos de germoplasma, índices de produtividade e também para a verificação da resistência a patógenos (Cardoso *et al.*; 2021). Uma dessas ferramentas são os marcadores moleculares do tipo ISSR e RAPD.

Marcadores moleculares são amplamente presentes em programas de melhoramento genético para a caracterização de diferentes espécies, sua funcionalidade é a identificação de sequências de DNA (Chen *et al.*, 2017). Os marcadores moleculares do tipo ISSR (Inter Single Sequence Repeats), permitem uma maior reprodutibilidade de suas aplicações, possuem entre 15 a 25 pares de bases (Felix *et al.*, 2020). Enquanto os marcadores moleculares do tipo RAPD são marcadores menos específicos em relação aos ISSR, possuem em torno de 10 a 15 pares de bases (Younis *et al.*, 2020). A análise por ISSR e RAPD com o gengibre também está presente na pesquisa de Ismail *et al.*, (2019), George, Raghav e George (2022) e Vidya *et al.*, (2021).

Metodologia

Dos 15 acessos de gengibre utilizados separou-se sua numeração de acordo com o local de origem no município de Santa Leopoldina, o número um veio da fazenda 1, o dois foi obtido na fazenda 2, os acessos de três a sete foram provenientes da fazenda 3, os acessos de 9 a 14 foram obtidos na fazenda 4 e o acesso número 15 foi obtido em mercado local na cidade de Alegre.

O procedimento foi feito no laboratório de genética e biologia molecular do IFES Campus de Alegre segundo o protocolo “mini-prep” de Doyle e Doyle (1990) com alterações propostas por Berilli *et al* (2013), aproximadamente 200 mg de folhas de gengibre foram macerados com nitrogênio líquido e transferidos para tubos de eppendorf, tal processo foi repetido com todas as 15 amostras. Após a maceração o 800µl do tampão de extração para DNA já aquecido foi adicionado 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 até obtenção de homogeneidade, os tubos foram incubados em banho maria 65°C por 30 a 40 minutos através de flutuadores, com agitação manual suave em um de intervalo de 10 minutos. Em seguida as amostras foram submetidas a centrifugação durante 14000 RPM por 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para novos tubos de eppendorf e clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) foi adicionado na mesma quantidade de volume. As amostras foram centrifugadas novamente a 14000 RPM por 5 minutos. O sobrenadante foi removido e transferido para novos tubos de eppendorf e o isopropanol gelado a 70% foi adicionado, com suave inversão e submissão a “overnight” na geladeira (4°C). Foi realizada centrifugação a 14000 RPM por 10 minutos, obtendo-se um “pellet”, que foi lavado duas vezes, na primeira lavagem com 300µl de etanol 70%, no segundo momento a lavagem foi realizada 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 submetido à incubação em banho maria com RNase 40 µg/ml a 37°C por 30 minutos. As concentrações de DNA foram quantificadas através de gel poliacrilamida a 10% e padronizadas na concentração de 10ng.µl⁻¹.

As reações de amplificação foram feitas através da PCR (Reação em Cadeia de Polimerase) com volume final de 15 µl contendo 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 RAPD ou ISSR e 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 ausência de DNA e adição de água no volume que seria destinado ao DNA foi adicionado à reação de PCR para verificar a ausência de contaminação nos produtos (Green e Sambrook; 2018).

O número de polimorfismo foi determinado através das análises de amplificação dos primers analisar sua diversidade e semelhança, neste estudo foram utilizados primers ISSR e RAPD selecionados através de uma triagem. Após tal processo os primers selecionados foram ISSR 5, ISSR 3, LOL 1, UBC 818, UBC 842, ISSR 17, ISSR 19, ISSR 20 obtidos através de estudos de Zietkiewicz *et al.*, (1994) com sugestões de Berilli *et al.* (2013), enquanto RAPD 16, RAPD 17, RAPD 18, RAPD 19, RAPD 20, RAPD 21, RAPD 22, RAPD 23, RAPD 24, RAPD 25, RAPD 26, RAPD 27, RAPD 28 e RAPD 29 foram obtidos através dos estudos de Williams *et al.*, (1990) e Tardin *et al.*, (2007).

As reações de amplificação foram realizadas no aparelho de termociclador segundo Akçali (2020) com algumas modificações, as configurações para o programa ISSR foram: Desnaturação a 94 °C por 5 minutos, 40 ciclos de amplificação de 94° por 30 segundos (desnaturação), 52 °C por 40 segundos (anelamento) no ISSR e 38°C por 40 segundos no RAPD, 72 °C por 1 minuto (extensão), 72 °C por 5 minutos e temperatura de estabilização a 25°C.

A eletroforese ocorreu a 220 volts por 2 horas e 30 minutos. A codificação das amostras foi realizada de duas formas, a primeira forma foi via brometo de etídio, e a segunda forma foi via revelação por nitrato de prata sendo fotografadas através do fotodocumentador.

A análise genética foi realizada através do Complemento Aritmético de Jaccard:

$$C_{ij} = 1 - a/a + b + c$$

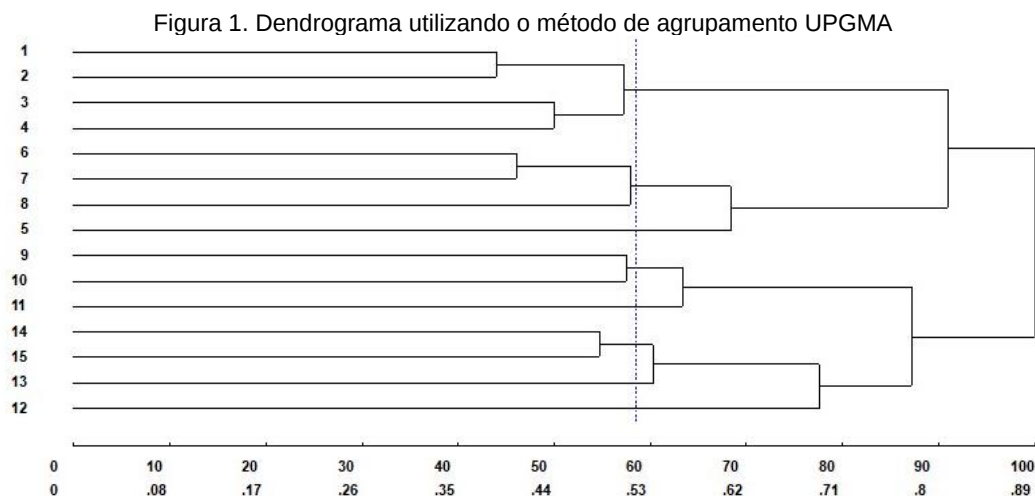
No qual a = 1 - 1: número de coincidência do tipo 1 e 1; b = 1 - 0: número de discordância do tipo 1 e 0; c = 0 - 1: número de discordância do tipo 0 e “1”. Sendo; 1 presença de banda e 0 a ausência de banda. Os dados foram tabelados através do programa excel e analisados no programa Genes no qual foi realizado o Método de Otimização de Tocher, Índice de Correlação Cofenética e o método de agrupamento UPGMA (Cruz; 2016).

Resultados

Foram testados 28 primers em 15 acessos de gengibre, os quais apresentaram um valor total de 345 marcas polimórficas e ausência de marcas monomórficas sendo oito ISSR e vinte RAPD

Através do método de Tocher foram formados oito grupos representados pela linha vertical na marca de distância de aproximadamente 58%, o primeiro composto pelo indivíduo 1 e 2; o segundo por 3 e 4;

o terceiro por 4 e 6; o quarto grupo com 7 e 9; o quinto com 8 e 10; o sexto com 11 e 13; o sétimo 12 e 14 e o oitavo possuindo apenas o indivíduo 15 (Bispo; 2020).



Fonte: NUNES; N.A. (2024)

Na reta vertical à esquerda do dendrograma estão representados os 15 genótipos de gengibre, na linha horizontal abaixo do gráfico encontra-se a distância em porcentagem definida pelo método de Tocher, as dissimilaridades foram organizadas segundo o método hierárquico UPGMA o qual realiza a organização das características através da união de suas segmentações, logo quanto mais próxima a linha de um indivíduo se encontra nas bifurcações mais próximo geneticamente ele é em relação ao outro. (Silva *et al*; 2021)

O valor da Correlação Cofenética a qual possui um valor total de aproximadamente 80,23%, que pode ser considerado bom, visto que quanto mais próximo de 100% melhor é o resultado segundo (Mir *et al*; 2021).

Discussão

Dos 28 primers utilizados para as análises moleculares, observou-se que o ISSR 11 obteve maior número de marcas polimórficas totalizando em 39 marcas, enquanto o ISSR 22 e o RAPD 18 obtiveram menor número de marcas totalizando em apenas 5 o menor número identificado entre os primers utilizados. A partir dos dados obtidos foi realizada a análise dos dados segundo o método de Tocher e o método de agrupamento de ligação média (UPGMA) apresentado em forma de dendrograma na Figura 1 (Oliveira *et al*; 2023).

A partir do dendrograma é possível observar que os indivíduos 1 e 2, ambos do mesmo grupo, são os mais próximos geneticamente, ambos foram obtidos em fazendas diferentes entre si e em relação aos demais, seguidos deles a similaridade genética encontra os indivíduos 3, 4, 6, 7, 8 e 5 ambos obtidos na fazenda 3, enquanto os próximos são os acessos 9, 10, 11 e 14 pertencentes à mesma fazenda seguidos do indivíduo 15 obtido em mercado local e os acessos 13 e 12 encontrados na fazenda 4. O indivíduo 12 proveniente da fazenda 4 foi o acesso com maior número de diversidade e diferença em relação aos outros acessos do dendrograma. (Khan *et al*; 2021)

A formação de 345 marcas polimórficas com o uso de primers RAPD e ISSR são essenciais para a caracterização da diversidade genética do gengibre, servindo de potencial para a realização de melhoramento genético e da importância de sua preservação com destaque aos bancos de germoplasma essenciais em um mundo onde a erosão genética se encontra cada vez mais agravante. (Ismail *et al*, 2019). Silva (2022) afirma que a alta divergência genética, demonstrada pelas distâncias no gráfico, garante um maior potencial de sucesso para a produção de híbridos.

Conclusão

Pode-se concluir que os indivíduos 1 e 2 são os mais próximos geneticamente, enquanto o indivíduo 12 é o portador de maior dissimilaridade. O primer de melhor desempenho foi o primer ISSR 11 com 39 marcas polimórficas. Também observamos que os primers RAPD obtiveram um melhor desempenho em relação aos primers ISSR. O estudo tem sua importância no potencial de classificar a diversidade genética dos acessos a fim de incentivar sua conservação e realizar o registro das cultivares.

Referências

- AMOM, T.; *et al.* Efficiency of RAPD, ISSR, iPBS, SCoT and phytochemical markers in the genetic relationship study of five native and economical important bamboos of North-East India. **Phytochemistry**, v. 174, p. 112330, 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0031942220301175>. Acesso em: 10 Ago. 2024.
- ARUMUGAM, T.; JAYAPRIYA, G.; SEKAR, T. Molecular fingerprinting of the Indian medicinal plant *Strychnos minor* Dennst. **Biotechnology Reports**, v. 21, p. e00318, 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2215017X19300153>. Acesso em: 2 Ago. 2024.
- 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. Disponível em: <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v35i4.17489>. Acesso em: 10 Ago. 2024.
- BISPO, R. B.; *et al.* Divergência genética entre genótipos de *Mauritia flexuosa* L. f. por meio de morfometria de frutos e sementes. **Nativa**, v. 8, n. 4, p. 585-590, 2020. Disponível em: <https://periodicoscientificos.ufmt.br/ojs/index.php/nativa/article/view/8622/7536>. Acesso em: 12 Ago. 2024.
- CARDOSO, E. dos S.; *et al.* Caracterização fenotípica e molecular de *Zingiber officinale* roscoe cultivado no norte de Mato Grosso, Brasil. **Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais**, v. 12, n. 6, p. 181-198, 2021. Disponível em: <https://sustenere.inf.br/index.php/rica/article/view/5736>. Acesso em: 2 Ago. 2024.
- CRUZ, C. D. Genes Software-extended and integrated with the R, Matlab and Selegen. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 38, p. 547-552, 2016. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/asagr/a/sLvDYF5MYv9kWR5MKgxb6sL/?lang=en>. Acesso em: 10 Ago. 2024.
- DOYLE, J. J. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v. 12, p. 13-15, 1990. Disponível em: <https://cir.nii.ac.jp/crid/1573950400018579968>. Acesso em: 4 Ago. 2024.
- FELIX, F. C.; *et al.* Applications of ISSR markers in studies of genetic diversity of *Pityrocarpa moniliformis*. **Revista Caatinga**, v. 33, p. 1017-1024, 2020. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rcaat/a/9XR8nWNVSL7CcSR33gLVJKJ/?lang=en>. Acesso em: 10 Ago. 2024.
- 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. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1155/2019/5904804>. Acesso em: 4 Ago 2024.
- GREEN, M. R.; SAMBROOK, J. The basic polymerase chain reaction (PCR). **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2018, n. 5, p. pdb. prot095117, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1101/pdb.prot095117>. Acesso em: 2 Ago. 2024.
- 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. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1155/2019/5904804>. Acesso em: 10 Ago. 2024.

KHAN, M. M. H.; *et al.* Genetic analysis and selection of Bambara groundnut (*Vigna subterranea* [L.] Verdc.) landraces for high yield revealed by qualitative and quantitative traits. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 7597, 2021. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-021-87039-8>. Acesso em: 10 Ago. 2024.

MIR, M. A.; *et al.* Deciphering genetic diversity analysis of saffron (*Crocus sativus* L.) using RAPD and ISSR markers. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 28, n. 2, p. 1308-1317, 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1319562X20306288>. Acesso em: 2 Ago. 2024.

OLIVEIRA, T. C. de.; *et al.* Divergência genética em acessos de feijão comum através de características morfológicas. **Cuadernos de Educación y Desarrollo**, [S. l.], v. 15, n. 4, p. 3540–3555, 2023. Disponível em: <https://ojs.europubpublications.com/ojs/index.php/ced/article/view/1317>. Acesso em: 12 Ago. 2024.

PADOVAN, M. da P.; *et al.* Desempenho da produção agropecuária no Espírito Santo de 2010 a 2022. **Incaper**. 2024. Disponível em: <https://biblioteca.incaper.es.gov.br/digital/bitstream/item/4703/1/Doc311-DesempenhodaProducaoES-Incaper.pdf>. Acesso em: 2 Ago. 2024.

SILVA, C.A. da *et al.* Genetic diversity in *Coffea canephora* genotypes for leaf nutrient concentration. **Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias UNCuyo**, v. 53, n. 1, p. 22-34, 2021. Disponível em: <https://revistas.uncu.edu.ar/ojs3/index.php/RFCA/article/view/3438/3337>. Acesso em: 10 Ago. 2024.

TARDIN, F. D.; *et al.* Selection index and molecular markers in reciprocal recurrent selection in maize. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Londrina, v. 7, n. 3, p. 225-233, 2007. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/handle/doc/490284>. Acesso em: 10 Ago. 2024.

UCHOI, A.; *et al.* Efficiency of RAPD and ISSR markers system in accessing genetic variation of Indian citron (*Citrus medica* L.) cultivars collected from different parts of India. **Indian J Biotechnol**, v. 16, p. 346-356, 2017. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/322615665_Molecular_markers_in_assessing_genetic_variation_of_Indian_citron_Citrus_medica_L_cultivars_collected_from_different_parts_of_India. Acesso em: 10 Ago. 2024.

VIDYA, V.; *et al.* Development of EST-SSR markers based on transcriptome and its validation in ginger (*Zingiber officinale* Rosc.). **Plos one**, v. 16, n. 10, p. e0259146, 2021. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0259146>. Acesso em: 4 Ago. 2024.

WILLIAMS, J. G. K.; *et al.* DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v. 18, n. 22, p. 6531-6535, 1990. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/18.22.6531>. Acesso em: 10 Ago. 2024.

YOUNIS, A.; *et al.* Molecular markers improve abiotic stress tolerance in crops: a review. **Plants**, v. 9, n. 10, p. 1374, 2020. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2223-7747/9/10/1374>. Acesso em: 10 Ago. 2024.

ZIETKIEWICZ, E.; RAFALSKI, A.; LABUDA, D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. **Genomics**, v. 20, n. 2, p. 176-183, 1994. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0888754384711517>. Acesso em: 10 Ago. 2024.

Agradecimentos

Agradecemos ao apoio do projeto pela FORTAC (Fortalecimento da Agricultura Capixaba), a FAPES (Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo), a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), ao Ifes (Instituto Federal do Espírito Santo) e aos nossos orientadores que apoiaram a presente pesquisa.