

Diversidade genética molecular em acessos de açafrão utilizando marcadores RAPD

José Baldin Pinheiro^{1*}, Maria Imaculada Zucchi², Fábio Luís Teles¹ e Naira Adorno Ázara¹

¹Escola de Agronomia, Universidade Federal de Goiás-Campus Samambaia, C. P. 131, 74001-970, Goiânia, Goiás, Brasil.

²Departamento de Genética-Esalq/USP. Av. Pádua Dias, 11 C. P. 83, 13400-970, Piracicaba, São Paulo, Brasil. *Autor para correspondência. e-mail: baldin@agro.ufg.br

RESUMO. O açafrão, *Curcuma longa* (Zingiberaceae) assume grande importância na indústria alimentícia e é considerado como a solução para a substituição de corantes sintéticos, além de ser utilizado também pelas suas propriedades medicinais e farmacológicas. Este trabalho teve como objetivo analisar a diversidade genética, com base em marcadores moleculares RAPD, entre vinte acessos obtidos em diferentes regiões do Brasil, uma vez que são raros os estudos genéticos com essa espécie. Para a caracterização da variabilidade genética, foram utilizados quarenta e cinco locos polimórficos. Os dados binários obtidos foram usados para o cálculo do índice de similaridade de Jaccard, que gerou o dendrograma feito a partir do agrupamento pelo critério UPGMA, no qual verificou-se a formação de dois grupos em que os acessos IAC se distanciam dos demais cultivares, e estes do gengibre usado como padrão. A estruturação da variabilidade genética foi verificada por meio da Amova. A proporção da variabilidade genética existente entre três grupos pré-estabelecidos, quanto à origem de coleta dos genótipos de açafrão, permitiu verificar que 44,49% da variabilidade genética está entre grupos e a maior parte da variação se encontra dentro dos grupos.

Palavras-chave: RAPD, *Curcuma longa*, variabilidade genética.

ABSTRACT. Molecular genetic diversity in accesses of saffron using RAPD markers. The Saffron, *Curcuma longa* (Zingiberaceae) assumes a great importance in the food industry, and it is considered as the solution for synthetic coloring. In addition, it can also be used by its medicinal and pharmacological properties. The aim of this work was to analyze the genetic diversity, based on RAPD molecular markers among 20 accesses obtained from different areas of Brazil. For the genetic variability characterization, 45 polymorphic loci were used. The obtained binary data were used to calculate the Jaccard's index of similarity, which generated the dendrograms following the UPGMA grouping criteria. The formation of 2 groups was verified, where the IAC accesses were distanced, and the ginger ones were used as standard. The structuring of the genetic variability was verified through the Amova. Based on the Amova's analysis, the proportion of the existent genetic variability among the 3 pre-established accesses allowed verifying 44.49% of genetic variability among the groups and the most part of the variation was found within the groups.

Key words: RAPD, *Curcuma longa*, genetic variability.

Introdução

O açafrão (*Curcuma longa*) é uma planta de origem indiana, introduzida no Brasil no período do bandeirantismo como marcador de trilhas para as jazidas de ouro. Sua cultura assume grande importância na indústria alimentícia, pois vem ganhando o mercado mundial como solução para a substituição de corantes sintéticos, além de ser

utilizado também pelas suas propriedades medicinais e farmacológicas (Scartezini e Speroni, 2000).

Dentre as fontes de corantes naturais mais utilizadas na indústria de alimentos, encontra-se o açafrão, um rizoma do qual podem ser obtidas substâncias como a curcumina, demetoxi-curcumina e bis-demetoxicurcumina. Esses pigmentos apresentam coloração amarela e capacidade de substituir corantes artificiais (Chassagnez *et al.*, 1997).

Existem muitos dados na literatura indicando uma grande variedade de atividades farmacológicas de *Curcuma longa* (Zingiberaceae), tais como: antiinflamatório, antibacteriana, antiimuno-deficiência viral humana, efeitos antioxidantes e atividade nematicida (Araújo e Leon, 2001). A curcumina é o componente mais encontrado no açafrão e é responsável pelos efeitos biológicos citados *in vitro*, a curcumina apresenta atividade antiespasmódica, antiinflamatória, inibidora da carcinogênese e do desenvolvimento do câncer. *In vivo*, esses experimentos mostram potencial antiparasitismo, antiinflamatório, e, nesta forma, apresentam aplicações em animais (Araújo e Leon, 2001).

Na Índia, encontra-se a maior biodiversidade, abrigando o reservatório de germoplasma IISR, que possui 715 acessos conservados “*ex-situ*” e “*in vitro*” (Sasikumar et al., 1999). O NBPGR (Programa Nacional de Estudos e Conservação de Recursos Genéticos), outro reservatório de Recursos Genéticos, acumulou e caracterizou 769 acessos de açafrão e seus parentes selvagens pertencentes a 31 espécies distintas (Velayudhan et al., 1996).

Verificou-se que, em *Curcuma longa*, o número de cromossomos é de $2n=48$, e o conteúdo de DNA variou significativamente de 3.12 a 5.26pg entre as variedades de curcuma (Das et al., 1998).

No Brasil, é cultivado em várias e distintas regiões, destacando-se o município de Mara Rosa, em Goiás, onde é explorado em maior escala.

Os cultivares de açafrão produzidos no Brasil possuem uma denominação arbitrária e são chamados de acordo com a área de cultivo, carecendo assim de uma classificação mais exata no que se refere à existência de diferenças entre os cultivares. Alguns trabalhos realizados abordaram esse assunto somente sobre seu comportamento em campo, destacando respostas a tratamentos culturais e à avaliação de caracteres morfológicos. Faltam informações para se recomendar cultivares e subsidiar a produção quanto à diferença entre os genótipos.

Radhakrishnan et al. (1995) avaliaram seis cultivares de curcuma, que foram comparados em condições chuvosas por três estações, de 1991 a 1994; porém os melhores cultivares para produção de matéria verde apresentaram pouco teor de curcumina após a secagem. Em outro estudo, Yadav et al. (1996) avaliaram dezessete genótipos de curcuma, que foram cultivados em estação de seca, objetivando estudar a variabilidade genética, a herdabilidade e o ganho genético. Nesse estudo, foram encontradas diferenças significativas para todos os caracteres avaliados, com exceção da largura das folhas.

Acredita-se na existência de mistura de acessos nos cultivares brasileiros utilizados para o plantio. A grande dificuldade de utilização e preservação dos cultivares tradicionalmente usados por agricultores é a existência de um mesmo acesso com vários nomes em diferentes localidades. Essa ocorrência é generalizada, e algumas tentativas têm sido realizadas no sentido de se caracterizar os cultivares que realmente são divergentes no aspecto genético.

Existem muitos trabalhos na literatura utilizando marcadores de DNA para a caracterização da variabilidade genética em muitas espécies de populações naturais (Debenhan et al., 2000; Jaggi et al., 2000; Brown e Tansley, 2000; Bouzat, 2001), além de estudos de caracterização genética de cultivares (Hofstra et al., 2000; Mühlen et al., 2000; Franco et al., 2001).

Huff et al. (1993) estudaram a variação genética entre e dentro de populações, pela primeira vez, utilizando populações naturais de *Buchlœ dactyloides*, por meio da metodologia de análise de variância molecular descrita por Excoffier et al. (1992), para estudar haplótipos de mitocôndria em humanos. Embora não tenha sido desenvolvida para estudos de dados gerados por marcadores RAPDs, essa análise tem sido muito aplicada atualmente em estudos de populações de plantas (Fisher et al., 2001; Sun e Wong, 2001).

Os marcadores moleculares apresentam-se como uma ferramenta para a caracterização genética, e assim contribuem para amenizar e ratificar os problemas relacionados a duplicações em bancos de germoplasma, bem como a identificação de cultivares divergentes (Nass, 2001). O presente trabalho teve por objetivo avaliar a divergência genética entre acessos de açafrão com base em marcadores moleculares RAPD, para orientar a recomendação de genótipos para cultivo.

Material e métodos

O DNA dos 20 genótipos coletados em várias localidades do Brasil (Tabela 1) foi extraído a partir dos rizomas por meio do método do CTAB, descrito por Murray e Thompson (1980) e Rogers e Bendich (1985), com modificações.

Foram utilizados *primers* polimórficos do Kit A e F (40 *primers*), sendo que 18 deles se mostraram polimórficos (OPA-01, OPA-03, OPA-04, OPA-05, OPA-06, OPA-07, OPA-08, OPA-09, OPA-10, OPA-016, OPA-20, OPF-01, OPF-02, OPF-03, OPF-05, OPF-06, OPF-07 e OPF-09). Utilizaram-se nas reações de amplificação 25 µL contendo: 10 mM Tris HCl pH 8.3; 50 mM de KCl; 2.5 mM MgCl₂; 0.20 mM dNTPs; 30 ng de *primer* (Operon Technologies), 30 ng de DNA molde, 2 unidades

de Taq polimerase e H₂O q.s.p. As reações de amplificação foram submetidas a um ciclo inicial para denaturação de 94°C por 5'; 48 ciclos de 92°C por 1', 37°C por 1' e 30'', 72°C por 1' e 30'' e um ciclo final de polimerização de 72°C por 6'. Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese feita em agarose a 1,4%, e como corante foi utilizado o brometo de etídeo.

Tabela 1. Identificação das localidades onde foram coletados os diferentes acessos de açafrão

Identificação	Origem dos acessos	Denominação
1	Alexânia - GO	Alexânia
2	Goiânia - GO	Goiânia 1
3	Botucatu - SP	Botucatu
4	Ibitinga - SP	Ibitinga
5	Lavras - MG	Lavras
6	Campinas - SP	IAC 1
7	Campinas - SP	IAC 2
8	Mara Rosa - GO	SR
9	Mara Rosa - GO	H
10	Mara Rosa - GO	W1
11	Mara Rosa - GO	W2
12	Mara Rosa - GO	W3
13	Mara Rosa - GO	I1
14	Mara Rosa - GO	I2
15	Mara Rosa - GO	I3
16	Mara Rosa - GO	AL
17	Mara Rosa - GO	AF1
18	Mara Rosa - GO	AF2
19	Mara Rosa - GO	ED
20	Goiânia - GO	Goiânia 2
21	Campinas - SP	Gengibre

A partir de 18 *primers* polimórficos selecionados, foram obtidos 45 locos polimórficos que foram utilizados para gerar uma matriz de dados binários, utilizada para calcular a similaridade genética pelo índice definido por Jaccard (Alfenas *et al.*, 1998)

$$S_j = 100 \frac{a}{a + b + c}$$

sendo:

a = número de casos em que ocorre a presença da banda em ambos indivíduos, simultaneamente;

b = número de casos em que ocorre a presença da banda somente no indivíduo X;

c = número de casos em que ocorre a presença da banda somente no indivíduo Y.

A partir desses índices, foi construído um dendrograma, conforme a metodologia descrita por Sneath e Sokal (1973), pelo método do UPGMA. A estabilidade dos agrupamentos foi testada pelo procedimento de reamostragem por 10.000 bootstrap, com o auxílio do software dBood (Coelho, 2001).

O valor cofenético foi calculado informando o quanto a matriz de dados original é explicada pelo dendrograma obtido. Todas as análises citadas acima foram feitas por meio do programa NTSYS (Rolf, 1989).

A decomposição da variância molecular entre e dentro dos grupos de cultivares foi realizada por meio de uma abordagem de Amova (Análise de Variância Molecular) (Excoffier *et al.*, 1992). Para a verificação da variabilidade entre grupos, classificaram-se os cultivares em três grupos: 1) grupo de cultivares do estado de Goiás-Mara Rosa; 2) grupo de cultivares do IAC; e 3) grupo de cultivares de outras localidades do Brasil.

Resultados e discussão

Com os 18 *primers* selecionados, foram obtidos 45 locos polimórficos, de um total de 61 locos gerados, os quais foram utilizados na caracterização da variabilidade genética. O *primer* que gerou o maior número de bandas polimórficas foi o OPF-05 (7 bandas polimórficas, conforme Figura 1).

A partir da matriz gerada pelos índices de similaridade calculados dois a dois, foi construído o agrupamento pelo método UPGMA. Por meio do dendrograma formado, verificou-se a formação de dois grupos em que os acessos provenientes do Instituto Agronômico de Campinas (6 e 7) apresentam uma similaridade de 0,62 em relação aos demais genótipos de açafrão. O gengibre, utilizado como padrão, quando comparado aos diferentes acessos, apresentou a menor similaridade (0,30), como era esperado.

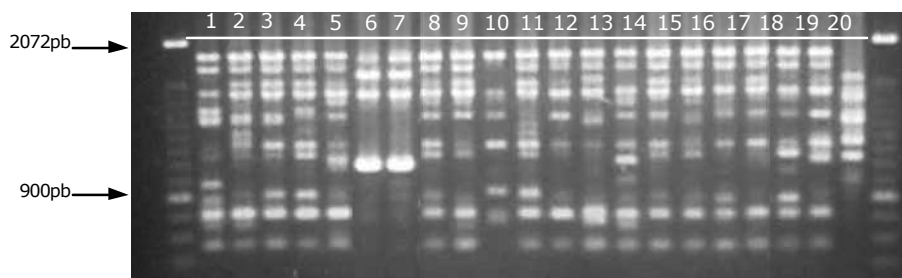


Figura 1. Perfil de um gel de RAPD utilizando o *primer* OPF - 05 em 20 acessos de açafrão e um de gengibre, sendo nas extremidades o padrão de peso molecular (ladder 100 pb)

Verificou-se a semelhança de alguns acessos, sugerindo que são os mesmos genótipos. Observou-se que os acessos 2, 3 e 5, coletados em três locais diferentes (Goiânia-GO, Botucatu-SP e Lavras-MG), são considerados geneticamente iguais a partir da análise realizada com 45 locos polimórficos de RAPD.

Entre os genótipos coletados em Mara Rosa-GO, verificou-se pequena divergência genética entre os grupos formados pelos acessos 10, 11, 14 e 18 vs 9, 12, 15 e 19. O acesso 8 foi o menos similar entre aqueles coletados no estado de Goiás (0,89), sendo ele proveniente da propriedade Santa Rosa, no município de Mara Rosa.

Os resultados permitiram concluir que existe variabilidade entre os clones utilizados pelos agricultores, sendo os acessos obtidos junto ao Instituto Agronômico de Campinas os mais divergentes daqueles explorados comercialmente no estado de Goiás.

Conforme a estruturação visualizada no dendrograma (Figura 2), pode-se concluir que os genótipos de açafrão obtidos no IAC (Instituto Agronômico de Campinas) são divergentes dos demais acessos plantados nos Estados de São Paulo, Minas Gerais e Goiás.

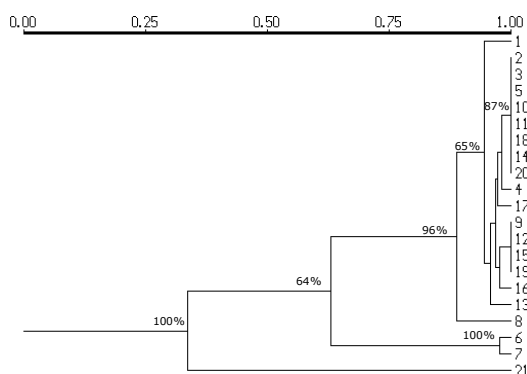


Figura 2. Dendrograma feito a partir de 20 genótipos de açafrão e um gengibre, por meio do índice de similaridade de Jaccard e agrupamento UPGMA

O valor cofenético obtido foi de 0,99, revelando que o dendrograma explicou muito bem os dados da matriz original.

A proporção da variabilidade genética existente entre os três grupos de genótipos pré-estabelecidos com base na análise da Amova, permitiu verificar que 44,49% da variabilidade genética se encontra entre grupos ($\phi_{ST} = 0,4449$), e 55,51% dentro dos grupos (Tabela 2).

Esta análise permitiu definir os genótipos mais divergentes e calcular a variabilidade genética entre

grupos de acessos. Este estudo proporcionou também a caracterização dos genótipos e uma futura recomendação de materiais a serem utilizados pelos produtores, com base na divergência genética associada a estudos de características morfológicas como produtividade.

Tabela 2. Análise da variância molecular (Amova) obtida a partir de três grupos pré-estabelecidos quanto à origem de coleta dos genótipos de açafrão

Fonte de variação	G. L.	SQ	% de variação
Entre grupos	2	20,192	44,49
Dentro de grupos	18	31,284	55,51
Total	20	51,476	

$\phi_{ST} = 0,4449$

Estudos da variabilidade genética com *Curcuma* são raros na literatura. Paisooksantivatana et al. (2001) estudaram a diversidade genética de *Curcuma alismatifolia* Gagnep. (Zingiberaceae), na Tailândia, por meio de marcadores isoenzimáticos. Plantas selvagens e cultivadas foram analisadas para sete locos isoenzimáticos, sendo verificada a ocorrência de alta diversidade genética em todas as populações em que a porcentagem de locos polimórficos variou de 85,7% a 100% nas espécies cultivadas, e 100% dos locos foram polimórficos nas populações naturais. Neste estudo, utilizando marcadores RAPD, observou-se 74% de locos polimórficos (45 num total de 61 locos). Os autores relatam ainda que a diversidade genética dentro de populações foi de 0,586-0,611, para as populações cultivadas, e de 0,621-0,653, nas populações selvagens. Esse dado foi semelhante ao encontrado neste estudo, que encontrou 0,55 da variação dentro de grupos, isto é, concordante com o sistema de propagação da espécie, propagação vegetativa, sendo raras às vezes em que a espécie floresce e se reproduz sexualmente.

O conhecimento da distribuição da variabilidade genética, entre e dentro de grupos de acessos, é essencial para a adoção de estratégias eficientes para conservação de germoplasma em condições *ex situ* e *in situ* (Nass, 2001).

A caracterização molecular da diversidade genética do germoplasma pode fornecer dados úteis para auxiliar o melhorista na identificação e na seleção dos genitores ou clones básicos para estabelecer o programa de melhoramento. A informação sobre a diversidade genética pode auxiliar num programa de melhoramento, bem como evitar as redundâncias ou misturas de genótipos em estudos e programas de conservação de germoplasma.

Com base nos resultados obtidos, pôde-se constatar a formação de grupos em que os acessos

estão organizados, separando-se aqueles provenientes do IAC das demais origens. Os acessos coletados em Mara Rosa-GO mostraram pequena divergência, sugerindo que pode existir uma mistura de clones sendo utilizada no plantio comercial. Novos genótipos divergentes devem ser introduzidos na região, visando a um melhor aproveitamento agrônomo da cultura, como, por exemplo, os acessos do IAC. Os resultados obtidos devem ser associados, num estudo futuro, a avaliações de desempenho agrônomo.

Referências

- ALFENAS *et al.* Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins - fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1998.
- ARAÚJO, C.A.C.; LEON, L.L. Biological activities of *Curcuma longa* L. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v.96, n.5, p. 723-728, 2001.
- BOUZAT, J.L. The population genetic structure of the greater Rhea (*Rhea americana*) in an agricultural landscape. *Biol. Conserv.*, Essex, v.99 n.3, p.277-284, 2001.
- BROWN, C.R.; TANSLEY, S.A. RAPD variation in the rare and endangered *Leucadendron elimensen* (Proteaceae): implications for their conservation. *Biol. Conserv.*, Essex, v.95, n.1, p. 39-48, 2000.
- CHASSAGNEZ, A.L.M. *et al.* Extração de oleoresina de curcuma (*Curcuma longa* L) com CO₂ supercrítico. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 17, no.4, p. 399-404, 1997.
- COELHO, A.S.G. Dboot - Avaliação dos erros associados a estimativas de distâncias/similaridades genéticas através do procedimento de bootstrap com número variável de marcadores. Goiânia: Laboratório de Genética Vegetal, Instituto de Ciências Biológicas - UFG, 2001.
- DAS, A.B. *et al.* Karyotype analysis and cytophotometric estimation of nuclear DNA content in some member of the Zingiberaceae. *Cytobios*, Cambridge, v.384, p.23-33, 1998.
- DEBENHAN, P. *et al.* Genetic structure of populations of the red sea urchin *Strongylocentrotus franciscanus*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, Amsterdam, v. 253, no. 1, p. 49-62, 2000.
- EXCOFFIER, L; *et al.* Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, Chapel Hill, v.131, p. 479-491, 1992.
- FISHER *et al.* RAPD variation among and within small and large population of the rare clonal plant *Ranunculus reptans* (Ranunculaceae). *Am. J. Bot.*, Columbus, v.87, n.8, p.1128-1137, 2001.
- FRANCO, M.S. *et al.* Caracterização da diversidade genética em feijão por meio de marcadores RAPD. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 36, no. 2, p. 381-385, 2001.
- HOFSTRA, D.E. *et al.* RAPD profiling and isozyme analysis of New Zealand *Hydrilla verticillata*. *Aquat. Bot.*, Amsterdam, v. 66, no. 2, p. 153-166, 2000.
- HUFF, D.R.; *et al.* RAPD variation within and among natural populations of outcrossing buffalograss (*Buhoë dactuloides* (Nutt.) Elgen), *Theor. Appl. Genet.*, Berlim, v.86, p.927-934, 1993.
- JÄGGI, C. *et al.* Genetic variability in subpopulations of the asp viper (*Vipera aspis*) in the Swiss Jura mountains: implications for a conservation strategy. *Biol. Conserv.*, Essex, v. 94, no. 1, p. 69-77, 2000.
- MÜHLEN, G.S. *et al.* Variabilidade genética de etnovarietades de mandioca, avaliada por marcadores de DNA. *Scientia Agricola*, Piracicaba, v.57, no.2, p.319-328, 2000.
- MURRAY, M.G.; THOMPSON, W.F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res.*, Oxford, v. 8, p. 1134-1137, 1980.
- NASS, L.L. Utilização de recursos genéticos vegetais no melhoramento. In: NASS, L.L. *et al.* (Ed.) *Recursos genéticos e melhoramento*. Rondonópolis, UFMT. 2001. 1183p.
- PAISOOKSANTIVATANA, Y. *et al.* Genetic diversity of *Curcuma alismatifolia* Gagnep (Zingiberaceae) in Thailand as revealed by allozyme polymorphism. *Genet. Resour. Crop Evol.*, Dordrecht, v.48, n.5, p.459-465, 2001.
- RADHAKRISHNAN, V.V. *et al.* Performance of different varieties of tumeric (*Curcuma longa* L.) in the hight ranges of Idukki district of Kerala. *India Cocoa Arecanut Spices journal*, Kerala, v. 19, no. 1, p.8-10, 1995.
- ROGERS, S.O.; BENDICH, A.J. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plants tissues. *Plant Mol. Biol.*, Dordrecht, v. 5, p. 69-76, 1985.
- ROLF, F.J. *NTSYS-Pc: Numerical taxonomy and multivariate Analysis System*. New York: Exceter Publisher, 1989.
- SASIKUMAR, B. *et al.* Spice diversity and conservation of plants that yield major spices in India. *Plant Genetic Resources Newsletter*, Rome, v.118, p.19-26, 1999.
- SCARTEZZINI, P.; SPERONI, E. Review on some plants of Indian traditional medicine with antioxidant activity, *J. of Ethnopharmacol.*, Limerick, v.71, p.23-43, 2000.
- SNEATH, P.H.; SOKAL, R. R. *Numerical taxonomy: the principles and prattice of numerical classification*. San Francisco: W. H. Freeman, 1973.
- SUN M; WONG K.C. Genetic structure of three orchid species with contrating breeding systems using RAPD and allozyme markers, *Am. J. Bot.*, Columbus, v.88, n.12, p.2180-2188, 2001.
- VELAYUDHAN, K.C. *et al.* The conspectus of the genus *Curcuma* in India. *J. Econ. Taxon. Bot.*, Jodhpur, v.20, p.375-378, 1996.
- YADAV, D.S. *et al.* Studies on genetic varibility in tumeric (*Curcuma longa* L.). *J. Hill Res.*, Gangtok, v.9, p.33-36, 1996.

Received on August 07, 2002.

Accepted on June 18, 2003.