



CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE GENÓTIPOS DE PINHÃO MANSO UTILIZANDO RAPD

Geisenilma Maria Gonçalves da Rocha¹; Fábila Suelly Lima Pinto²; Liziane Maria de Lima²; Nair Helena Castro Arriel².

¹UEPB (geisenilma@hotmail.com); ²Embrapa Algodão.

RESUMO – Mundialmente, *Jatropha curcas*, vem sendo almejada como uma fonte potencial para a produção de biocombustível, ela é cultivada em diversos países tropicais, onde vem sendo construído bancos de germoplasma da espécie. Na Embrapa, uma coleção de genótipos vem sendo organizada e caracterizada por técnicas moleculares. Neste estudo utilizaram-se, como ferramenta molecular, marcadores moleculares para auxiliar o estudo da variabilidade genética visando ao melhoramento genético da espécie. A relação genética entre 19 genótipos de *Jatropha curcas* foi avaliada com base em *Random Amplication of Polymorphic DNA* (RAPD), utilizando-se 26 primers da série Operon. 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 os critérios de agrupamento de UPGMA e otimização de Tocher. Os *primers* RAPD produziram um total de 140 bandas geradas. O tamanho dos fragmentos amplificados variou de aproximadamente 200 a cerca de 2000 pares de base.

Palavras-chave – *Jatropha curcas*, marcador molecular, variabilidade genética.

INTRODUÇÃO

Jatropha curcas (L.), conhecida no Brasil, popularmente como pinhão manso, é uma planta perene da família das Euphorbiaceae com grande valor econômico agregado. O gênero *Jatropha* compreende 200 espécies distribuídas principalmente nas regiões tropicais do México, América Central e África (DEHGAN e WEBSTER, 1979). Essa planta possui conhecido valor medicinal, e atualmente, vem despertando interesse como uma fonte potencial de óleo vegetal, podendo o óleo metilado ser, efetivamente, utilizado como um substituto do petróleo, em particular na produção do biodiesel (KUMAR et al., 2009; KING et al., 2009). A demanda por óleos vegetais como fonte de biocombustíveis tem crescido nos últimos tempos devido aos preços do petróleo e da necessidade de redução da emissão de CO₂. Apesar do interesse, existem razões técnicas e econômicas, como a necessidade de conhecimentos sobre o crescimento vegetativo e reprodutivo e do manejo da espécie, a falta de caracterização dos recursos genéticos e a falta de experiência na comercialização de seus produtos,





que limitam a cultura do pinhão manso em larga escala (OPENSHAW, 2000). Os óleos vegetais, sobretudo os não comestíveis, compreendem uma importante alternativa para produção de biocombustíveis por não competir com oleaginosas utilizadas como fontes de alimentos.

O óleo de pinhão manso é rico em hidrocarbonos, com 27 a 48,5% do conteúdo do óleo da semente, e o teor de ácido oléico predomina entre os ácidos graxos encontrados nas sementes, enquanto que outras espécies de *Jatropha* contem o ácido linoleico como o ácido graxo dominante (KUMAR et al., 2009).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o polimorfismo entre genótipos de pinhão manso, utilizando marcadores moleculares do tipo RAPD, a fim de estimar, preliminarmente, a diversidade genética em genótipos de pinhão manso disponível na coleção de trabalho da Embrapa Algodão.

METODOLOGIA

Para a extração de DNA genômico foram utilizadas folhas jovens de 19 genótipos de pinhão manso, plantadas na sede da Embrapa Algodão, provenientes de material selecionado no campo de produção de Itaporanga-PB. O tecido vegetal fresco, aproximadamente 200 mg, foi coletado e imediatamente procedido a extração, seguindo o protocolo DArT. O tecido foi macerado em microtubos de 2 mL, na presença de nitrogênio líquido, até a obtenção de um pó fino. Aos tubos foram adicionados 600 µL de tampão de extração aquecido a 65 °C (CTAB 2%; NaCl 5 M; EDTA pH 8.0, 0.5 M; Tris pH 8.0, 0.2 M; PVP 2% e 2 µL de β-mercaptoetanol) e incubado em banho-maria por 1 hora a 65 °C, vertendo os tubos a cada 20 minutos. Após a incubação, os tubos foram resfriados a temperatura ambiente e em seguida, centrifugados a 12000 rpm por 20 minutos a 4 °C. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo e foi adicionado 600 µL de isopropanol gelado. Centrifugado a 12000 rpm por 30 minutos a 4 °C, descartado o sobrenadante e lavado o precipitado duas vezes com etanol 70 % gelado. Por fim, o precipitado foi lavado com etanol absoluto gelado e deixado secar a temperatura ambiente. O DNA foi ressuscitado com 250 µL de água Milli-Q, corados com SYBR green, analisados em gel de agarose 0.8% e fotodocumentados.

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), MgCl₂ (6,25 mM), BSA (0,006 mg), dNTPs (0,25 mM), primer (0,38 µM), Taq DNA polimerase (1,5 unidades). As reações foram conduzidas em um termociclador com o seguinte programa: desnaturaçã o 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. Foram utilizados 26 primers da série Operon para as ampliações, os fragmentos amplificados foram separados em gel de agarose 1% e fotodocumentados.

A análise da diversidade genética foi feita utilizando o programa Genes (CRUZ, 2001). Nas avaliações dos géis, cada banda é considerada uma variável qualitativa, atribuindo-se o valor 1 para a banda presente, e zero quando ausente. De posse desses dados foi construída uma matriz de 0 a 1, e a estimativa de similaridade genética (S_{ij}) entre cada par de genótipos foi calculada pelo coeficiente de Jaccard(J).

O Coeficiente de Jaccard é definido pela seguinte expressão:

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

s_{ij} - e a similaridade genética entre o par de cultivares i e j .

a - a presença da banda em ambas as populações (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 01).

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 pelo método aglomerativo de otimização de Tocher, a representação simplificada das distâncias genéticas foi feita através de um dendrograma e da projeção das distâncias num plano tridimensional a fim de facilitar a identificação ente os acessos de acordo com o grau de dissimilaridade (CRUZ, 2001).





RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 59 iniciadores utilizados, 26 foram selecionados por apresentarem quantidade, qualidade e reprodutibilidade de bandas amplificadas, num total de 140 bandas geradas. O número de bandas produzidas por iniciador variou de 2 (primer 16A) a 9 (primer 14B), com média de 5 bandas por iniciador. O tamanho dos fragmentos amplificados variou de aproximadamente 200 a cerca de 2000 pb.

Ressalta-se, que as diferenças entre os genótipos foram determinadas mais em função da frequência de bandas e não quanto à presença ou ausência de bandas específicas.

A partir de uma análise descritiva das estimativas de distâncias geradas pelo coeficiente de dissimilaridade, constatou-se que a distância entre os pares de genótipos variou de 0,075 a 0,528, destacando-se os genótipos 4 e 9 como os mais divergentes e os genótipos 3 e 6 como os mais similares.

O resultado da hierarquização dos genótipos pelos métodos do UPGMA (Figura 1), identificou o agrupamento dos indivíduos a partir das dissimilaridade entre os genótipos. Nota-se que, ao se adotar um percentual de divergência genética em torno de 50%, constata-se a formação de sete diferentes agrupamentos heteróticos. Em que quatro grupos são unitários, constituídos pelos genótipos 1, 2, 4 e 9, um quinto grupo formado pelos genótipos 3, 5, 6, 8, 10, 11, 12 e 13, o sexto grupo foi formado pelos genótipos 14, 15 e 16 e o sétimo grupo constituído dos genótipos 17, 18 e 19. Constata-se, ainda na Figura 1, que as estimativas de distâncias a partir do coeficiente de Jaccard estão bem representadas pelos pares de genótipos mais similares (3 e 6) e os mais divergentes (4 e 9). Entretanto, o agrupamento pelo método de otimização de Tocher (Tabela 1) identificou a formação de dez grupos, em que nove agrupamentos foram formados por pares de genótipos, enquanto o genótipo 19 foi o mais divergente. Na representação gráfica das estimativas de distância num plano tridimensional (Figura 2) constata-se novamente a maior divergência dos genótipos 4 e 9, enquanto os demais agruparam-se basicamente em um único conglomerado. Os diferentes resultados das técnicas de agrupamento ressaltam a importância do emprego de mais de um método de agrupamento, em função das diferenças de critérios de ordenação que cada método utiliza, isto permite que a classificação dos grupos se complementem, corroborando os resultados na identificação dos indivíduos dentro de um determinado subgrupo de genótipos.





CONCLUSÃO

A caracterização por meio dos marcadores RAPD apresentou baixa divergência entre os genótipos de pinhão manso avaliados, identificando pares de genótipos bastante similares. A maior divergência foi observada nos genótipos 4 e 9, em relação aos demais genótipos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CRUZ, C. D.; **Programa Genes: Versão windows: aplicativo computacional em genética e estatística**. Viçosa: UFV, Imprensa Universitária, 2001, 648p.

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

DEHGAN, B.; WEBSTER, G.L. Morphology and intrageneric relationships of the genus *Jatropha* (Euphorbiaceae). **Univ. Calif. Publ. Bot.** v. 74, p. 1–73, 1979.

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.

Protocolo de extração de DNA de plantas para DArT (Diversity Arrays Technology). Disponível em <www.triticarte.com.au/pdf/DaRT_DNA_isolation.pdf>. Acesso em: 01/05/2010.

KUMAR, R.S.; PARTHIBAN, K.T.; HEMALATHA, R.; KALAISELVI, T.; RAO, M.G. Investigation on Cross-Compatibility Barriers in the Biofuel Crop *Jatropha curcas* L. with Wild *Jatropha* Species. **Crop Sci.** v. 49, p. 1667–1674, 2009.

KING, A.J.; HE, W.; CUEVAS, J.A.; FREUDENBERGER, M.; RAMIARAMANANA, D.; GRAHAM, I.A. Potential of *Jatropha curcas* as a source of renewable oil and animal feed. **Journal of Experimental Botany**, v. 60, n. 10, p. 2897–2905, 2009.

OPENSHAW, K. A review of *Jatropha curcas*: an oil plant of unfulled promise. **Biomass and Bioenergy**, v. 19, p. 1-15, 2000.

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



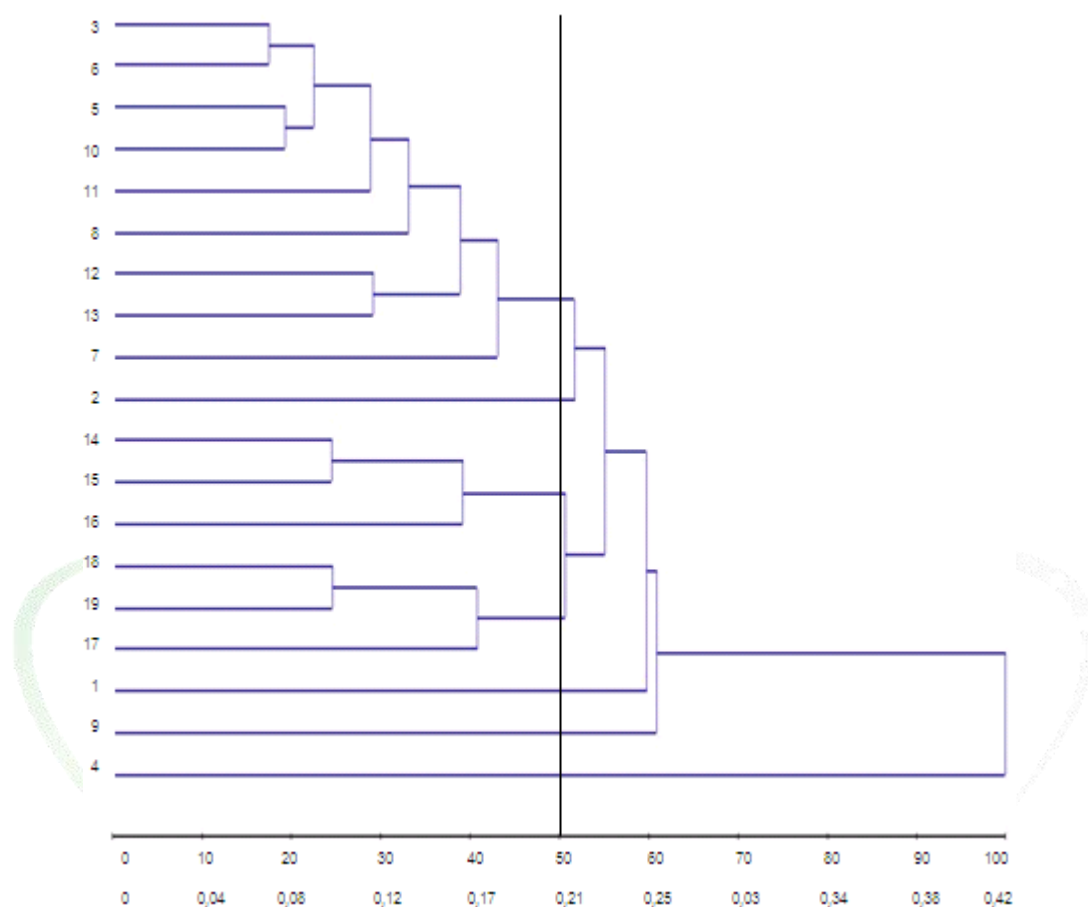


Figura 1 – Dendrograma do agrupamento UPGMA construído a partir do complemento aritmétrico do Coeficiente de Jaccard entre 19 genótipos de pinhão manso, considerando os marcadores RAPD.

Tabela 1 – Agrupamento dos genótipos de pinhão manso pelo método de otimização de Tocher, a partir de dados de marcadores RAPD.

GRUPO	INDIVÍDUOS
A	1 e 2
B	3 e 5
C	4 e 6
D	7 e 9
E	8 e 10
F	11 e 13
G	12 e 14
H	15 e 17
I	16 e 18
J	19



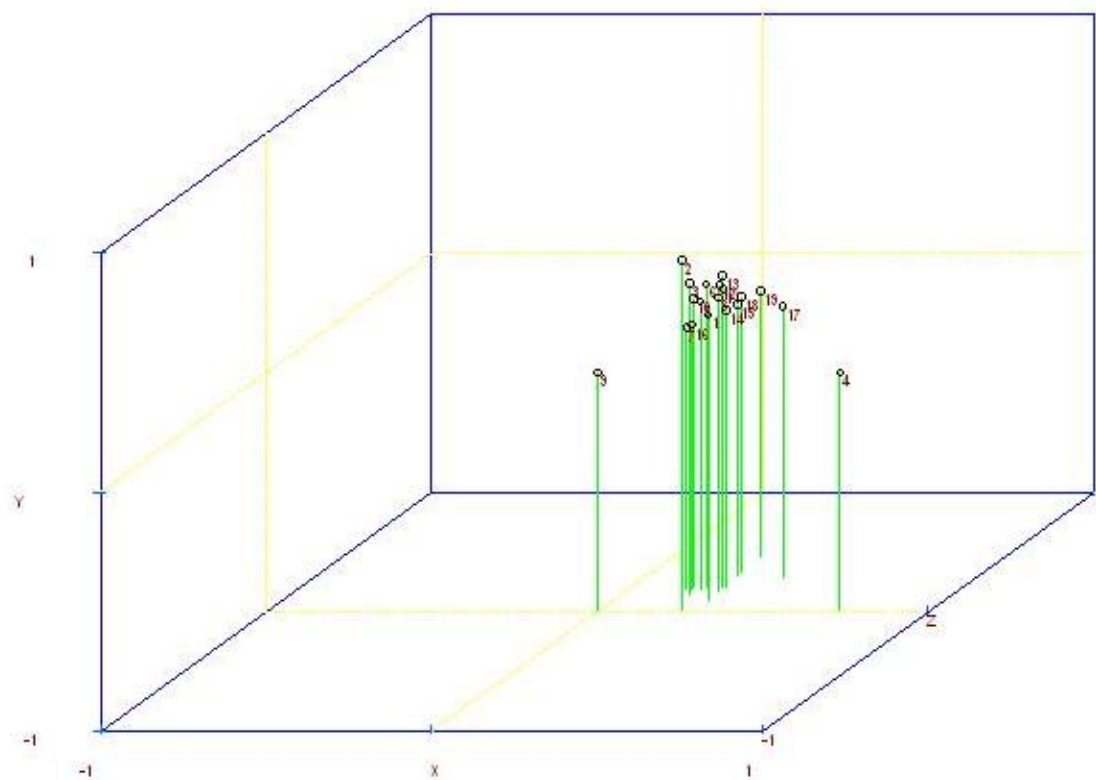


Figura 2 – Projeção gráfica das estimativas de distâncias de dissimilaridade de 19 genótipos de pinhão manso a partir de marcadores RAPD.

