

CARACTERIZAÇÃO DA ESTRUTURA GENÉTICA DO PINHÃO MANSO (*Jatropha curcas* L.): ISOLAMENTO DE FRAGMENTOS DE DNA ENRIQUECIDOS COM SEQUÊNCIAS DE MICROSSATÉLITES

Fábio Barros Britto, EMBRAPA Meio-Norte, fbbritto@yahoo.com

Fábio Mendonça Diniz, EMBRAPA Meio-Norte, fmd1@cpamn.embrapa.br

Adilson Kenji Kobayashi, EMBRAPA Meio-Norte, adilson@cpamn.embrapa.br

Paulo Sarmanho Costa Lima, EMBRAPA Meio-Norte, sarmanho@cpamn.embrapa.br

Eugênio Celso Emérito Araújo, EMBRAPA Meio-Norte, emerito@cpamn.embrapa.br

Paul Bentzen, Dalhousie University, paul.bentzen@dal.ca

RESUMO: O pinhão manso (*Jatropha curcas*) é uma planta oleaginosa que vem se destacando por apresentar um alto potencial na produção de biocombustíveis. Por este motivo o interesse em sua exploração comercial vem aumentando consideravelmente. Assim, torna-se imprescindível o desenvolvimento de tecnologias moleculares de monitoramento e seleção de populações naturais e cultivares. Nesse contexto, marcadores moleculares como os *microsatélites* são amplamente utilizados. No entanto, os genomas de organismos eucariontes são muito amplos e, assim, o isolamento de seqüências de microsatélites específicas, que possam atuar como marcadores, torna-se uma tarefa complexa. O presente trabalho teve como objetivo estabelecer um protocolo para isolar fragmentos de DNA específicos contendo *loci* de microsatélites. Este procedimento tem por finalidade aumentar a incidência das seqüências alvo para futura clonagem. Foram testadas diferentes enzimas de restrição e sondas de DNA para o reconhecimento e captura de fragmentos contendo seqüências de microsatélites. Os resultados obtidos mostraram que a enzima *RsaI* apresentou o melhor padrão de digestão do DNA, enquanto as melhores sondas foram as compostas pelas repetições (AATG)₆, (AAAC)₆, (AATC)₆ e (AAAG)₆. Estes procedimentos constituem etapas fundamentais no processo de isolamento de microsatélites e contribuirão para a caracterização da estrutura genética do pinhão manso. Com isto, será possível avaliar quais os estoques mais adequados para seleção de linhagens viáveis para o cultivo, visando ganhos na produtividade.

Palavras-Chave: Enzimas de Restrição, Sondas, Biodiesel, Oleaginosas.

INTRODUÇÃO

O pinhão manso (*Jatropha curcas*) é uma planta com possível origem na América Central e, atualmente, está distribuída por quase todas as regiões do mundo (Cortesão, 1956; Peixoto, 1973; Fairless, 2007). Há pouco tempo, o interesse comercial pela espécie foi despertado pelo seu potencial na produção de combustíveis alternativos devido, principalmente, à sua alta produtividade de óleo (Berchmans e Hirata, 2008). Sendo uma espécie existente em climas desfavoráveis à maioria das culturas alimentares e que ocorre de forma espontânea em áreas de solos pouco férteis (Arruda *et al.*, 2004), o pinhão manso pode ser considerado uma das mais promissoras oleaginosas para substituir o diesel de petróleo. É muito resistente a doenças e ao ataque de insetos, moluscos e fungos, pois segrega látex cáustico, que escorre das folhas arrancadas ou feridas (Lakshmanan *et al.*, 1990; Abdel-Hamid, 2003; Emeasor *et al.*, 2005).

Com o crescente interesse na exploração e cultivo comerciais do pinhão manso, torna-se imprescindível o desenvolvimento de tecnologias moleculares de monitoramento e seleção de populações naturais e cultivares. A própria sustentabilidade da atividade deve passar pela implementação de técnicas moleculares, baseadas na análise de DNA. Nesse contexto, marcadores moleculares como os *microsatélites* vêm sendo amplamente utilizados. Os *microsatélites* são seqüências repetidas de nucleotídeos, distribuídas ao longo do genoma, que ocorrem, principalmente, em regiões não codificantes (Schlötterer & Wiehe, 1999; Hancock 1999). Essas seqüências são utilizadas como marcadores devido ao seu padrão altamente polimórfico. Podem atuar não apenas na conservação de recursos genéticos de interesse comercial, mas também na seleção de linhagens viáveis ao cultivo e identificação de *loci* de características quantitativas (QTLs) relacionados a doenças ou reprodução (Nambisan, 2007). No entanto, os genomas de organismos eucariontes são muito amplos e o isolamento de seqüências de *microsatélites* específicas que possam atuar como marcadores torna-se uma tarefa complexa. Deste modo, o presente trabalho teve como objetivo estabelecer um protocolo para isolar fragmentos de DNA contendo *loci* de *microsatélites*. Este procedimento tem por finalidade aumentar a incidência das seqüências alvo, que serão, futuramente, destinadas à clonagem e seqüenciamento para a determinação dos marcadores.

MATERIAL E MÉTODOS

O método aplicado encontra-se descrito em detalhes em Hamilton *et al.* (1999), McPherson *et al.* (2001), e Diniz *et al.* (2004; 2005). Seu princípio básico pode ser observado na **Figura 1**.

Extração do DNA

DNA de alto peso molecular foi extraído de folhas jovens de um único espécime de pinhão manso, utilizando-se o *DNase Plant Mini Kit* (Qiagen®). A qualidade e concentração do DNA foram verificadas por eletroforese em gel de agarose a 1 %, contendo brometo de etídio.

Teste das enzimas de restrição

A primeira etapa do experimento consistiu em testar diferentes enzimas de restrição (do tipo *blunt end*) para a obtenção de fragmentos de DNA entre 300 e 1000 pares de bases (pb) (**Fig. 1B**). Para isto foram utilizadas as enzimas *RsaI*, *BstUI*, *HincII* e *DraI*. Após a digestão, adaptadores SNX foram ligados às extremidades dos fragmentos, utilizando-se a enzima T4 DNA ligase (**Fig. 1C**). Em seguida, o material foi amplificado por reação em cadeia da polimerase (PCR) para aumentar a concentração do DNA, sendo que os adaptadores SNX atuaram como sítios de anelamento para os *primers*. Os detalhes da PCR encontram-se descritos nos trabalhos supracitados.

Avaliou-se, então, a qualidade da digestão e amplificação por eletroforese em gel de agarose. Uma digestão satisfatória deve apresentar um rastro homogêneo, intenso, com fragmentos maiores que 300pb e sem a presença de bandas (a ocorrência de bandas indicaria uma alta concentração de fragmentos idênticos e, portanto, baixa variedade de microssatélites). As amostras que atenderam às exigências foram destinadas ao protocolo de *enriquecimento*, descrito abaixo.

Enriquecimento das seqüências alvo: avaliação das sondas

Para aumentar a concentração dos fragmentos contendo as seqüências alvo, realizou-se o processo de enriquecimento. Para isto, foram utilizadas sondas de DNA (ligadas covalentemente a moléculas de biotina) que possuíam seqüências complementares com possíveis alvos. As sondas testadas foram: (ACTC)₆, (ACTG)₆, (ACCT)₆, (ACAG)₆, (AATG)₆, (AAAC)₆, (AATC)₆ e (AAAG)₆. As quatro primeiras sondas foram agrupadas em uma única solução (2,5µM cada) sendo esta denominada de *Mix A*. O mesmo procedimento foi realizado com as sondas restantes, as quais foram denominadas *Mix B*. Estes agrupamentos foram realizados devido às semelhanças em suas Tm's.

Por meio da biotina, as sondas foram ligadas a esferas metálicas contendo estreptavidina, formando uma ligação forte e não covalente entre ambas as proteínas. Em seguida, adicionou-se o complexo *esfera+sonda* ao DNA do pinhão manso (**Fig. 1D**). Assim, as seqüências alvo foram isoladas das demais com o auxílio de um campo magnético (**Fig. 1E**). Após este procedimento, uma nova PCR foi realizada para amplificar os fragmentos contendo os microssatélites. Estes foram submetidos a uma eletroforese em gel de agarose, onde determinou-se as melhores sondas para se obter as amostras enriquecidas com as seqüências de interesse. O procedimento de enriquecimento foi repetido por duas vezes, conforme *Diniz et al.* (2007), para maximizar a exclusão dos fragmentos sem microssatélites.

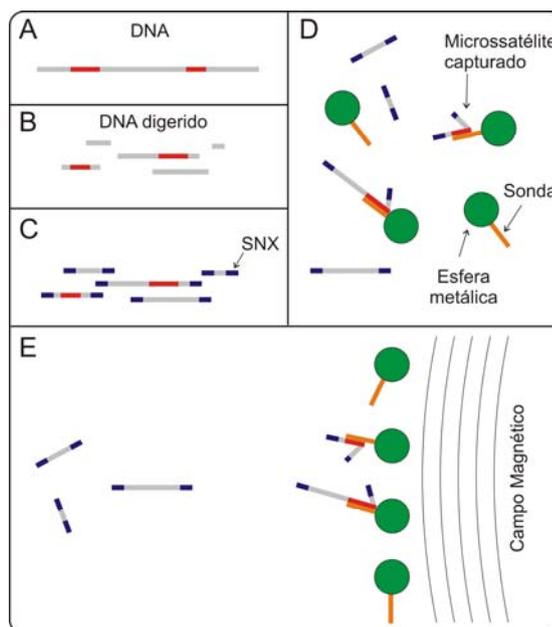


Figura 1: (A) DNA genômico íntegro. As regiões vermelhas indicam *loci* contendo os microssatélites. (B) DNA genômico digerido com enzimas de restrição do tipo *blunt end*. (C) Ligação do oligonucleotídeo SNX (em azul) nas extremidades dos fragmentos de DNA (este atua como sítio de ligação de primers para futuras PCR's). (D) Sondas (em laranja) ligadas à esferas metálicas (em verde) são adicionadas à solução de DNA digerido. As sondas se ligam especificamente às repetições do tipo microssatélite. (E) Os fragmentos contendo microssatélites são isolados por atração magnética.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram testadas as enzimas *RsaI*, *BstUI*, *HincII* e *DraI*, as quais geraram fragmentos variando de cerca de 300 a 1500pb a partir de uma amostra de DNA íntegra e de alto peso molecular (**Fig. 2A e 2B**). No entanto, apenas as enzimas *RsaI* e *DraI* foram selecionadas, pois apresentaram rastros intensos e homogêneos. A enzima *BstUI* apresentou fragmentos do tamanho desejado, porém, em baixa concentração e, assim, não foi utilizada nos procedimentos posteriores. Já a digestão com *HincII*, levou à formação de bandas que indicaram alta concentração de fragmentos com a mesma seqüência e, portanto, também não foi utilizada (**Fig. 2B**).

Desta forma, as amostras digeridas com *RsaI* e *DraI* foram destinadas ao protocolo de enriquecimento, utilizando-se as sondas descritas como *Mix A* e *Mix B* (ver item Material e Métodos para detalhes) e posterior PCR dos fragmentos enriquecidos com as seqüências de interesse. Para o DNA digerido com *DraI*, obteve-se o isolamento de fragmentos tanto com o *Mix A* quanto com o *Mix B*. No entanto, após a PCR, observou-se a formação de bandas que comprometeram a utilização das amostras para os futuros procedimentos (**Fig. 2C**). Já o enriquecimento com o *Mix B*, das amostras digeridas com a enzima *RsaI*, apresentou-se satisfatório. Estas sondas capturaram moléculas variando de 300 a 700 pb (**Fig. 2C**). As sondas do *Mix A* capturaram poucas moléculas do DNA alvo (**Fig. 2C**). Assim, o melhor protocolo estabelecido para o enriquecimento de DNA de pinhão manso, contendo seqüências de microssatélites, foi a digestão com a enzima *RsaI* e posterior captura dos fragmentos utilizando-se as sondas do *Mix B*.

A escolha da enzima de restrição para o procedimento aqui descrito está mais relacionada com as características apresentadas pelo genoma do que com a enzima em si. Já que o fator determinante para a ação da enzima é o reconhecimento de seqüências específicas (5'-GT[^]AC-3' para *RsaI*; Lynn *et al.*, 1980), a freqüência com que estas seqüências ocorrem no genoma é que determinam o melhor tipo de enzima.

A maior incidência de fragmentos capturados com *Mix B* está de acordo com a informação descrita por Carvalho *et al.* (2008), o qual determinou que mais de 60% do genoma de *J. curcas* apresenta-se constituído por Adenina e Timina (sendo a Adenina o componente mais abundante deste *Mix*).

Após determinar a melhor combinação *enzima-sonda* descrita acima, o mesmo DNA previamente digerido e enriquecido passou por um novo processo de enriquecimento, para maximizar a exclusão dos fragmentos que não continham as moléculas alvo (**Fig. 2D**). A

mesma estratégia foi utilizada para o isolamento de microssatélites em lagostas e resultou em um ganho significativo na quantidade de *loci* isolados após a clonagem e sequenciamento, obtendo-se, em alguns casos, 100% de clones contendo as seqüências alvo (Diniz *et al.*, 2007).

Estes procedimentos constituem etapas fundamentais no processo de isolamento de microssatélites e, após a clonagem e determinação dos marcadores, contribuirão para a caracterização da estrutura genética do pinhão manso.

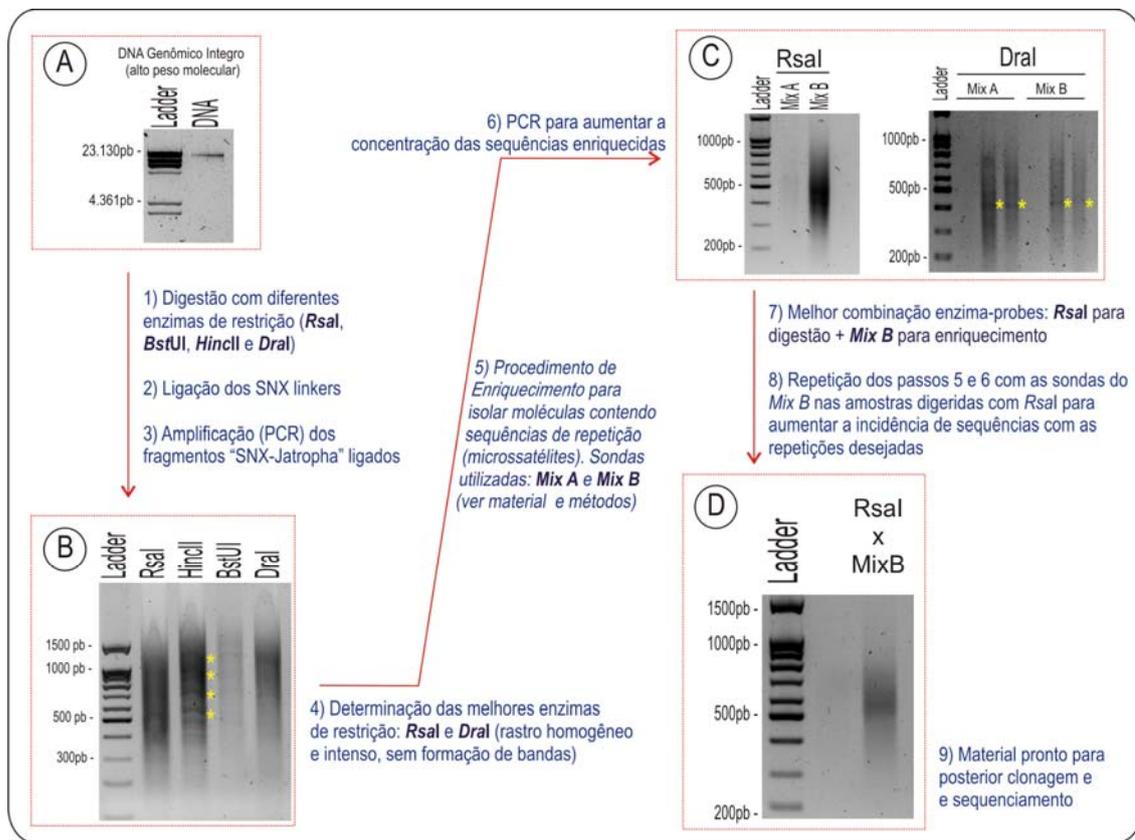


Figura 2: Sumário dos resultados obtidos no processo de isolamento de fragmentos enriquecidos com seqüências alvo. (A) DNA genômico íntegro e de alto peso molecular; (B) Amostra de DNA após digestão com enzimas de restrição e PCR. A ocorrência de bandas é indicada por asteriscos. (C). Fragmentos alvo capturados por sondas e enriquecidos; (D) Fragmentos obtidos após repetição do processo de enriquecimento.

CONCLUSÃO

O presente trabalho determinou o protocolo mais viável para as etapas iniciais do isolamento de marcadores microssatélites para o pinhão manso. O melhor tipo de enzima de restrição para a digestão inicial do DNA foi *RsaI*. Já as sondas com o melhor resultado para o processo de enriquecimento foram (AATG)₆, (AAAC)₆, (AATC)₆ e (AAAG)₆. Estas são etapas preliminares, porém, fundamentais no processo de isolamento de *loci* de microssatélites para a caracterização da estrutura genética do pinhão manso. De posse destas informações, os próximos passos desta pesquisa envolverão a construção de uma biblioteca genômica parcial para o desenho de primers em seqüências que atuarão como marcadores específicos para *J. curcas*. Assim, o desenvolvimento destes marcadores tem em vista sua aplicação na avaliação dos estoques mais adequados para seleção de linhagens viáveis para o cultivo, visando ganhos na produtividade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-HAMID, H.F. Molluscicidal and in-vitro schistosomicidal activities of the latex and some extracts of some plants belonging to Euphorbiaceae, **J. Egypt. Soc. Parasitol.** 2003, v. 33, pp. 947–954.
- ARRUDA, F.P.; BELTRÃO, N.E.M.; ANDRADE, A.P. PEREIRA, W.E.; SEVERINO, L.S. Cultivo de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) como alternativa para o semi-árido nordestino. **Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibrosas**, 2004, v.8, n.1, p.789-799.
- BERCHMANS, H.J.; HIRATA, S. Biodiesel production from crude *Jatropha curcas* L. seed oil with a high content of free fatty acids, **Bioresour. Technol.** 2008, v. 99, pp. 1716–1721.
- CARVALHO, C.R.; CLARINDO, W.R.; PRAÇA, M.M.; ARAÚJO, F.S.; CARELS, N. Genome size, base composition and karyotype of *Jatropha curcas* L., an important biofuel plant. **Plant Science**, 2008, doi:10.1016/j.plantsci.2008.03.010
- CORTESÃO, M. **Culturas tropicais: plantas oleaginosas**. Lisboa: Clássica, 1956. 231p.
- DINIZ, F.M.; MACLEAN, N.; PATERSON, I.G.; BENTZEN, P. Polymorphic tetranucleotide microsatellite markers in the Caribbean spiny lobster, *Panulirus argus*. **Molecular Ecology Notes**, v. 4, p. 327-329, 2004.
- DINIZ, F.M.; MACLEAN, N.; OGAWA, M.; PATERSON, I.G.; BENTZEN, P. Microsatellites in the overexploited spiny lobster *Panulirus argus*: isolation, characterization

of loci and potential for intraspecific variability studies. **Conservation genetics**, 2005, v. 6, p. 637-641.

DINIZ FM, IYENGAR A, LIMA PSC, MACLEAN N, BENTZEN P. Application of a double-enrichment procedure for microsatellite isolation and the use of tailed primers for high throughput genotyping. **Genetics and Molecular Biology**, 2007, v. 30, pp. 380-384.

EMEASOR, K. C., OGBUJI, R. O. AND EMOSAIRUE, S. O., Z. PFLANZENKR. Insecticidal activity of some seed powders against *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae) on stored cowpea. Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz - **Journal of Plant Diseases and Protection**, 2005, v. 112, n. 1, pp. 80–87.

FAIRLESS, D. Biofuel: the little shrub that could—maybe, **Nature** 2007, v. 449, pp. 652-655.

HAMILTON, M.B., PINCUS, E.L., DI FIORE, A., & FLESHER, R.C. A universal linker and ligation procedures for construction of genomic DNA libraries enriched for microsatellites. **Biotechniques**, v. 27, p. 500-507. 1999.

HANCOCK, J.M. 1999. Microsatellites and other simple sequence: Genomic context and mutational mechanisms. In: GOLDSTEIN, D.B.; SCHLOTTERER, C. (eds.) **Microsatellites: Evolution and Applications**. Oxford University Press, Ney York, 368p.

LAKSHMANAN, P.; MOHAN, S.; JEYARAJAN, R. Antifungal properties of some plant extracts against *Thanatephorus cucumeris*, the causal agent of collar rot disease of *Phaseolus aureus*. **Madras Agricultural Journal**, v.77, p.1-4, 1990.

LYNN, S.P.; COHEN, L.K.; KAPLAN, S.; GARDNER, J.F. *RsaI*: a new sequence-specific endonuclease activity from *Rhodopseudomonas sphaeroides*. **Journal of Bacteriology**, 1980, v. 142, pp. 380–383.

MCPHERSON, A.A., O'REILLY, P.T., MCPARLAND, T.L., JONES, M.W., BENTZEN, P. Isolation of nine novel tetranucleotide microsatellites in Atlantic herring (*Clupea harengus*). **Molecular Ecology Notes**, 2001, v. 1, p. 31-32.

NAMBISAN, P. Biotechnological intervention in jatropha for biodiesel production. **Current Science**, 2007, v. 93, n. 10, pp. 1347-1348.

PEIXOTO, A.R. **Plantas oleaginosas arbóreas**. São Paulo: Nobel, 1973. 284p.

SCHLOTTERER, C; WIEHE, T. 1999. Microsatellites, a neutral marker to infer selective sweeps. In: GOLDSTEIN, D.B.; SCHLOTTERER, C. (eds.) **Microsatellites: Evolution and applications**. Oxford University Press, Ney York, 368p.