

## CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE GENÓTIPOS DE PINHÃO-MANSO (*Jatropha curcas* L.)

Raquel Bartz Kneib (Embrapa Clima Temperado, raquelkneib@yahoo.com.br), Juliana Castelo Branco Villela (Embrapa Clima Temperado, jbrancov@gmail.com), Vanessa Galli (Embrapa Clima Temperado, vane.galli@yahoo.com.br), Natércia Lobato Pinheiro (Embrapa Clima Temperado, natercia.lobato@cpact.embrapa.br), Sérgio Delmar Dos Anjos e Silva (Embrapa Clima Temperado, sergio.anjos@cpact.embrapa.br).

**Palavras Chave:** SSR, diversidade genética, biodiesel.

### 1 - INTRODUÇÃO

Conciliar o aumento crescente no consumo energético com as mudanças climáticas globais é uma preocupação fundamental da sociedade contemporânea. Depósitos de combustíveis fósseis estão diminuindo rapidamente e seu consumo tem levado a uma mudança nos níveis de dióxido de carbono liberados na atmosfera. Assim, fontes alternativas de combustíveis, como o bioetanol e biodiesel mostram-se promissores para aliviar estes problemas causados pelo consumo de combustíveis fósseis.

O pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) é uma espécie pertencente à família das Euforbiáceas, sendo encontrada em quase todas as regiões intertropicais, com ocorrência em maior escala nas regiões tropicais e temperadas. Esta cultura apresenta potencial para produção de biodiesel por apresentar teores consideráveis de óleo (até 40%), e ainda características agrônomicas importantes na qualidade do óleo produzido. Além disso, por não se tratar de uma cultura alimentícia, não compromete a segurança alimentar, e seu cultivo em solos degradados pode auxiliar no controle da erosão, não competindo por áreas destinadas à produção de alimentos (Divakara et al., 2010; Natarajan e Parani, 2011).

Apesar destas características desejáveis, melhorias na produtividade e qualidade do óleo de suas sementes tem sido almejadas, incluindo: o aumento no conteúdo de óleo; o decréscimo no conteúdo de ácidos graxos insaturados (para aumentar a estabilidade oxidativa), de ácidos graxos livres (para impedir a formação de sabão e aumentar a produtividade de biodiesel), bem como de ácidos graxos de 18 carbonos (para reduzir a viscosidade melhorando a atomização do biodiesel); a tolerância à seca; a resistência a pestes e doenças (Natarajan e Parani, 2011).

Para tanto, um aspecto essencial para o avanço dos processos de melhoramento, bem como para a conservação do germoplasma, é a caracterização molecular, visando o conhecimento da variabilidade genética disponível. Os marcadores moleculares permitem avaliar, em curto prazo, elevado número de genótipos sem sofrer influência ambiental, como ocorre nos marcadores morfológicos, sendo que os marcadores microssatélite ou SSR (*Simple Sequence Repeats*) são utilizados na caracterização e avaliação de germoplasma e na identificação de genes de importância agrônômica, e tem permitido obter avanços consideráveis nos programas de melhoramento genético de diferentes culturas (Palmeiri e Maia, 2007).

Este trabalho teve como objetivo caracterizar plantas de pinhão manso para a identificação da variabilidade genética presente numa coleção conduzida na Embrapa Clima Temperado.

### 2 - MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no laboratório de biologia molecular da Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS, sendo analisados 58 genótipos de pinhão-manso de diferentes origens cultivados na unidade, utilizando seis pares de *primers* (tabela 1). A extração do DNA foi realizada segundo o protocolo descrito por Dart (2008), a partir de folhas jovens. As reações de PCR foram desenvolvidas em um volume final de 10 µl contendo 5 µl de GoTaq Master Green Mix (Promega), 50 ng de DNA e 1,4 µM de cada *primer* (*Forward e Reverse*). Foram utilizados 30 ciclos, sendo 52°C a temperatura de anelamento dos *primers*. O produto da amplificação foi separado em gel de agarose 3,5% e visualizado em UV utilizando Gel Red (Biotium®) como corante.

**Tabela 1.** *Primers* para locos SSR do genoma de pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.).

Nome do <i>Primer</i>	Sequência
JC01	<b>PF:</b> TCGGTATAGTTCATGCACAG <b>PR:</b> CCCATCTGATAACCTGGCTAC
JC07	<b>PF:</b> GATCCTCTGTGAGTGTGGCC <b>PR:</b> CCCAAGTTATCTCCAAATCC
JC08	<b>PF:</b> TGCCAACATGATGAGTAGTGTC <b>PR:</b> GCATTTAGCAGAACCCAG
JC10	<b>PF:</b> CTATGGGGATTCCAAGACAA <b>PR:</b> AATCAAATGGGCACTAAAGC
JC13	<b>PF:</b> TTGACTTTTTCTGAGTCTG <b>PR:</b> ACAAAAACACACATTCAA
JC14	<b>PF:</b> AGTACCAACTCCCAAGTTAT <b>PR:</b> GCTAAAACATGTTCTCTG

PF: *primer forward*; PR: *primer reverse*

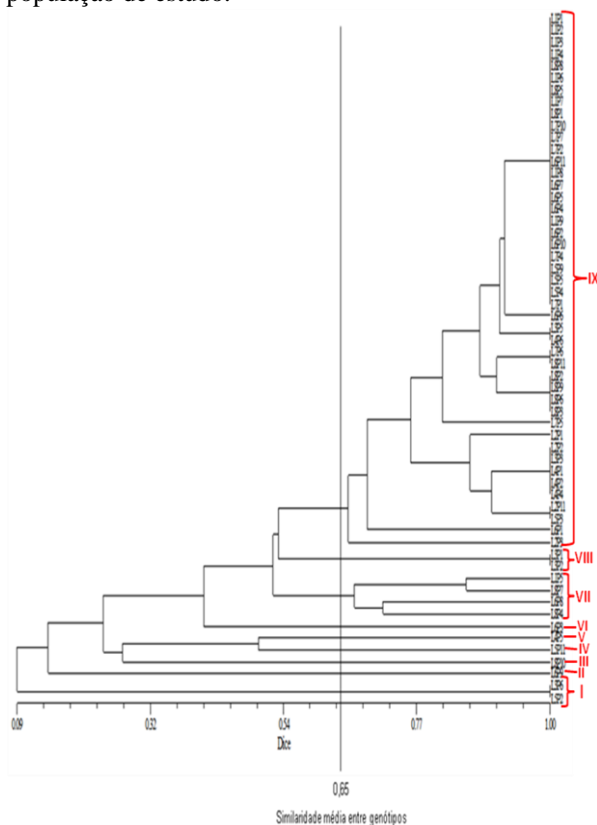
As análises de similaridade e de agrupamento dos genótipos foram realizadas a partir dos perfis (bandas) revelados nos géis, representados por matrizes binárias (ausência=0 e presença=1), empregando o coeficiente de similaridade Dice e o método da média aritmética não ponderada (UPGMA), com o auxílio do software NTSYS 2.15 (Rohlf, 2000). O dendrograma gerado foi seccionado sobre o valor médio de similaridade, para avaliar os grupos formados.

### 3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Devido a sua abundância e dispersão uniforme no genoma, marcadores SSR usualmente revelam altos níveis de polimorfismo. Neste estudo, os seis *primers* utilizados geraram um total de 13 bandas polimórficas, evidenciando a eficiência da técnica de SSR e a presença de variabilidade genética entre os acessos de pinhão

manso analisados. Esta variabilidade já havia sido observada em trabalhos anteriores utilizando estes *primers* em outros acessos do banco de germoplasma da Embrapa Clima Temperado (Moreira et al., 2009), contrastando com o resultado obtido por Sun et al. (2008), que observou variabilidade limitada em amostras de *J. curcas* coletadas na China, utilizando marcadores SSR, possivelmente por ter utilizado apenas marcadores com motivos (AC)<sub>15</sub>. Muitos dos acessos provenientes da Índia também não mostraram perfis moleculares distintos utilizando marcadores SSR e RAPD, conforme Basha e Sujatha (2007), indicando que a origem do pinhão-manso (América do Sul e México) pode ser o fator determinante na variabilidade encontrada nas amostras do presente estudo.

Na Figura 1 verifica-se a separação dos genótipos em nove grupos de similaridade genética, sendo: I) L3P6 e L5P2; II) L6P9; III) L8P10; IV) L5P11; V) L4P5; VI) L6P3; VII) L1P5, L8P7, L6P8 e L8P4; VIII) L3P1 e L3P2; IX) representado pela grande maioria dos genótipos. A Similaridade entre os genótipos variou de 0,09 a 1,00, demonstrando alta variabilidade na população de estudo.



**Figura 1.** Dendrograma de pinhão manso obtido a partir da análise de microsatélite em 58 genótipos, utilizando o índice de similaridade de DICE (1945) e o método de agrupamento UPGMA.

O coeficiente de correlação cofenética do dendrograma ( $r=0,98$ ) revelou alta correspondência entre a representação gráfica da similaridade genética e a matriz de similaridade, o que evidencia a robustez das inferências observadas na Figura 1.

A variabilidade em nível de DNA, encontrada no material avaliado, bem como a associação dos acessos divergentes com potencialidades agronômicas é muito importante para fins de melhoramento da cultura do

pinhão manso. Estas informações juntamente com os dados do seqüenciamento genômico de *Jatropha curcas*, recentemente publicado (Sato et al., 2011), permitirão a busca de outros marcadores moleculares especialmente relacionados com as características de interesse para a cultura, facilitando assim a caracterização deste germoplasma.

#### 4 - CONCLUSÕES

Os marcadores microsatélites são eficientes para detectar a variabilidade genética entre os genótipos de pinhão-manso. O germoplasma avaliado apresentou variabilidade genética importante para uso no melhoramento genético da cultura.

#### 5 - AGRADECIMENTOS

A FINEP e CNPq pelo financiamento da pesquisa.

#### 6 - REFERÊNCIAS

- <sup>1</sup>BASHA, S. D.; SUJATHA, M. **Inter and intra-population variability of *Jatropha curcas* characterized by RAPD and ISSR markers and development of population-specific SCAR markers.** Euphytica, 2007. v.156, p.375–386.
- <sup>2</sup>DART. \*Diversity Arrays Technology Pty. Ltd.\* <[http://www.diversityarrays.com/pub/DART\\_DNA\\_isolation.pdf](http://www.diversityarrays.com/pub/DART_DNA_isolation.pdf)>. Acesso em: 19 ago. 2008.
- <sup>3</sup>DIVAKARA, B. N.; UPADHYAYA, H. D; WANI, S. P.; LAXMIPATHI GOWDA, C. L. **Biology and genetic improvement of *Jatropha curcas* L.** Applied Energy, 2010. v.87, p.732-742.
- <sup>4</sup>MOREIRA, L. M.; SILVA, S. D. dos ANJOS; KNEIB, R. B.; VILLELA, J. C. B.; LEMÕES, J. S.; PINHEIRO, N. L. Caracterização molecular de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) conduzido na Embrapa Clima Temperado. In: I Congresso Brasileiro De Pesquisa Em Pinhão Manso, 2009, Brasília, DF. **Anais.** CD-ROM.
- <sup>5</sup>NATARAJAN, P.; PARANI, M. **De novo assembly and transcriptome analysis of five major tissues of *Jatropha curcas* L. using GSFLX titanium platform of 454 pyrosequencing.** BMC Genomics, 2011. v.12, n.191.
- <sup>6</sup>PALMIERI, D. A.; MAIA, L. C.. Marcadores microsatélites para estudos genéticos em mamona (*Ricinus communis* L.) e pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.). In: Congresso Internacional de Agroenergia e Biocombustíveis, 2007, Teresina. **Anais.** Teresina: Embrapa Meio Norte, 2007, p. 138-138.
- <sup>7</sup>SATO, S.; HIRAKAWA, H.; ISOBE, S. et al. **Sequence Analysis of the Genome of an Oil-Bearing Tree, *Jatropha curcas* L.** DNA Research, 2011. v.18, p.65-76.
- <sup>8</sup>SUN Q.B.; WU G.J.; GE X.J. **SSR and AFLP Markers Reveal Low Genetic Diversity in the biofuel plant *Jatropha curcas* L. in China.** Crop Science, 2008. v.48, p.1885-1870.
- <sup>9</sup>DICE, L.R. Measures of the amount of ecological association between species. Ecology, Washington, 1945 v.26, n.3, p.297-307.
- <sup>10</sup>ROHLF, F. J. NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.1. Exeter Software, New York, 2000. 98p.