



Marcadores moleculares para estudo de diversidade genética de acessos de *Jatropha curcas* L.

Francielle de Matos Feitosa, Anunciene Barbosa Duarte, Lucas Borges Ferreira,
Bruno Rafael Alves Rodrigues, Pedro Thiago Medeiros Paixão, Silvia Nietsche

Introdução

O pinhão manso (*Jatropha curcas*) é uma espécie perene, monóica, pertencente à família das euforbiáceas, a mesma da mamona (*Ricinus* sp.), mandioca (*Manihot* sp.) e seringueira (*Hevea* spp.). Acredita-se que a *Jatropha* seja originária da América Central; porém, vegeta espontaneamente em diversas regiões do Brasil [1].

O pinhão manso tem se destacado pelas excelentes perspectivas de sua utilização para produção de biodiesel. Essa planta está sendo explorada no Sudeste Asiático (Índia, China, Tailândia, Camboja, dentre outros), na África e na América Central e Caribe (Nicarágua, Belize e Cuba) [2].

O aumento na eficiência de seleção, o melhor conhecimento e caracterização do germoplasma e a maximização dos ganhos genéticos têm sido objetivos de melhoristas de plantas do mundo inteiro. Novas formas de alcançar estes objetivos têm sido constantemente perseguidas pelo melhoramento de plantas, por isso o interesse em tecnologias como as de marcadores de DNA ou moleculares. Os marcadores moleculares surgiram devido à necessidade de detecção de polimorfismo genético diretamente no DNA e têm sido consideradas ferramentas importantes e fundamentais em estudos relacionados com a estrutura de populações de plantas [3].

Uma das maneiras de conhecer uma espécie é estudando a sua diversidade genética por meio de características fenotípicas e moleculares. Estas informações são muito importantes para a condução de programas de conservação e melhoramento genético desta espécie. Mediante o exposto o objetivo do presente trabalho foi analisar a diversidade genética existente entre acessos de pinhão manso por meio de marcadores RAPD.

Material e métodos

O presente estudo foi desenvolvido no laboratório de biotecnologia do Departamento de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Montes Claros – Unimontes. Foram coletadas folhas jovens de 6 genótipos de pinhão manso do banco de germoplasma da Unimontes – Campus de Janaúba/M.G. Os indivíduos foram identificados pelos seguintes números: 177, 174, 102, 156, 72 e 42. Durante o processo de coleta, selecionou-se folhas aparentemente saudáveis, com boa coloração adotando tais características como padrão, sendo retirada e descartada a nervura central das mesmas restando apenas o limbo foliar. O material foi envolvido em papel alumínio previamente identificado, acondicionado em recipiente resfriado, protegido da incidência de luz e conduzido ao Laboratório acima referido. A extração do material vegetal foi realizada utilizando-se o método proposto por Basha; Sujatha (2007) [4].

Cerca de 0,250 g de tecido fresco foi macerado com N₂ líquido em um cadinho com auxílio de um pistilo e incubado a 65°C por uma hora em microtubos de 2ml, adicionou-se 800µL de tampão de extração (2%CTAB; 1,4M NaCl, 20mM EDTA pH8; 100mM Tris-HCl pH 8,0; 3% PVP; 1% β-mercaptoetanol). A cada 10 minutos as amostras eram agitadas com o vórtex. O extrato foi submetido a duas extrações com clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) e centrifugado por 5 minutos a 14.000 rpm em temperatura de 4°C, com posterior transferência do sobrenadante para novos microtubos de 1,5 ml previamente identificados, onde se adicionou isopropanol na proporção de 1:1 do volume recuperado e incubados a -20°C *over night* e depois centrifugados por 15 minutos a 14.000 rpm em temperatura de 4°C. Removeu-se o sobrenadante e o precipitado foi lavado uma vez em etanol 70% e uma vez com etanol 95%, para retirar o sal presente. A partir desta etapa foi feita uma modificação para a purificação do DNA [5] onde adicionou-se ao precipitado solução de 500 µl (10mM Tris HCl pH 8,0; 0,25 M NaCl) e dissolveu-o ao vórtex. Foi feita a adição 180 µl de etanol absoluto gelado. Em seguida, as amostras permaneceram no congelador -20 °C *over night*. Foram centrifugadas por 20 minutos a 14000 rpm, a 4 °C. Em seguida, transferiu-se o sobrenadante para um novo tubo onde se adicionou 700 µl de isopropanol e foram centrifugadas por 20 minutos a 14000 rpm, a 4°C. Realizou-se a remoção do sobrenadante e lavagem do precipitado com etanol 70% e etanol 95%. O precipitado foi novamente dissolvido com 200 µL de TE pH 8,0 (10 mM Tris-HCl e 1mM EDTA), contendo RNase na concentração final de 40 µg/ml. A solução ficou incubada em banho-maria a 37°C por 30 minutos. Após a incubação adicionou-se NaCl 5M na proporção de 1:10 e 2/3 do volume



de isopropanol gelado para precipitação do DNA, que foi incubado novamente a -20°C , por 2 a 3 horas. Posteriormente foi feita a centrifugação e lavagem do precipitado com etanol 70% e 95%, o mesmo precipitado foi ressuspensão em 200 μL de TE.

Para verificação da qualidade do DNA utilizou-se um mini gel de agarose 0,8%, corado em solução de brometo de etídeo (0,2 mg/L). A quantidade do DNA foi estimada por espectrofotometria a 260/280 nm em espectrofotômetro FEMTO 700 Plus. A partir de então realizou-se a diluição, mantendo as amostras a 10ng de DNA/ μL .

Para análise RAPD, utilizou-se 8 *primers* tomados ao acaso, sendo eles: B10, OPC07, OPA01, OPJ01, OPB13, OPU17, OPJ15, OPR11. Para avaliação, foi verificado o perfil de amplificação de cada *primer* em gel de agarose após a eletroforese. A reação de PCR foi feita utilizando-se o termociclador TECHNE Modelo TC-412. As reações consistiram em uma fase inicial de desnaturação a 94°C por 4 minutos, seguida por 35 ciclos de desnaturação ($94^{\circ}\text{C}/30$ segundos), temperatura de anelamento específica para cada *primer* em função dos testes de temperatura de amplificação realizados, por 1 minuto e extensão ($72^{\circ}\text{C}/2$ minutos) e uma fase de extensão final de 72°C por 7 minutos. Logo após, reduziu-se a 10°C até a retirada das amostras.

Os produtos resultantes da PCR foram submetidos à eletroforese, em cuba horizontal em gel de agarose a 1,2% (p/v), contendo tampão TBE 1X por, aproximadamente, três horas, sob voltagem de 110V. Passado este tempo, os géis foram corados em solução de brometo de etídeo 0,2 mg/L por 15 minutos. Os géis foram fotografados sob fonte de luz ultravioleta, revelando os fragmentos de DNA corados com brometo de etídeo, em sistema digital de Fotodocumentação UVP® *Life Science software*. A análise foi feita por visualização em gel, registrando em uma planilha na qual os indivíduos foram genotipados quanto à presença (1) e à ausência (0) de fragmentos, gerando uma matriz binária. De posse destes dados foi realizada uma análise de agrupamento e a matriz de distância genética para realização do dendograma foi obtida pelo programa R (R Development Core Team, 2006).

Resultados

Todos os indivíduos apresentaram quantidades adequadas de DNA sendo possível submetê-los a reação de PCR.

Os 8 iniciadores RAPD amplificaram para todos os indivíduos analisados somando-se um total de 30 *loci* apresentando um bom padrão de amplificação (figura 1). Em média, cada *primer* formou 5 fragmentos que apresentaram tamanho variando de 600 a 1200 pb, aproximadamente.

A matriz de distância genética revelou variação de distância genética mínima de 0,20% e máxima de 0,32% para os indivíduos 174 e 102, respectivamente. Pela análise de agrupamento realizada verificou-se a formação de apenas 2 grupos distintos (figura 1). Isso indica que de forma geral os indivíduos testados apresentam-se muito similares, apresentando portanto, baixa divergência genética. Uma justificativa possível para tal ocorrência é o fato de estes pertencerem ao mesmo centro de origem. Basha *et al.* (2009) [6] estudando acessos de diferentes países também atribuíram a baixa diversidade genética, revelada por marcadores RAPD e ISSR, entre acessos de um mesmo país ao número reduzido de introduções iniciais de germoplasma de *J. curcas* nesses países. Verificaram ainda, que apenas acessos do México e de El Salvador tiveram variação com 12 marcadores microsatélites, enquanto acessos de outros países também não foram distinguíveis. Os resultados encontrados por este autor corroboram com a hipótese de ser o México o centro de origem de *J. curcas*, evidenciando a maior variabilidade dos materiais desse país [6].

Sun *et al.* (2008) [7] utilizando SSR e AFLP detectaram diversidade genética muito baixa entre os materiais analisados na China. Em contrapartida He *et al.* (2007) [8] usando marcador ISSR relatou alto nível de diversidade genética entre oito populações de *J. curcas*.

Basha; Sujatha (2007) [4] avaliaram a extensão da diversidade genética em um conjunto representativo de quarenta e dois acessos de *J. curcas* abrangendo diferentes zonas agro-climáticas da Índia, juntamente com um genótipo não tóxico do México através de 400 *primers* RAPD e 100 *primers* ISSR indicando níveis modestos de variação genética no germoplasma indiano. Corroborando com os resultados, entre 23 procedências selecionadas a partir de 300 progênies coletadas em toda a Índia, Reddy *et al.* (2007) [9] relataram polimorfismo relativamente baixo pelas técnicas de RAPD e AFLP.

Conclusão/Conclusões/Considerações finais

Os acessos de pinhão manso apresentam baixa divergência genética.

Agradecimentos (opcional)

Os autores agradecem à Unimontes, à FAPEMIG e ao CNPq pelo apoio.



Referências

- [1] LAVIOLA, B.G. *et al.* Recursos genéticos de pinhão manso para produção de biodiesel. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, 5., 2009, Guarapari. **Anais...** Guarapari: Sociedade Brasileira de Melhoramento de Plantas, Guarapari, 2009. JEOLAS, L. S.; KORDES, Hagen. Percursos acelerados de jovens condutores ilegais: o risco entre vida e morte, entre jogo e rito. **Horiz. antropol.**, Porto Alegre, v. 16, n. 34, dez. 2010.
- [2] TEIXEIRA, L. C. Produção de biodiesel. **Informe Agropecuário**, v. 26, n. 229, p. 79-86, 2005.
- [3] MILACH, S.C.K. **Marcadores de DNA**. Aplicações no melhoramento de plantas. 1998. Disponível em: <<http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio05/marcadoresdna.pdf>>. Acesso: 11 de agosto de 2011.
- [4] BASHA, S. D.; SUJATHA, M. Inter and intra-population variability of *Jatropha curcas* L. characterized by RAPD and ISSR markers and development of population-specific SCAR markers, **Euphytica**, v. 156, p. 375-386, 2007.
- [5] MICHAELS, S. D., AMASINO, R. M. Removal of polysaccharides from plant DNA by ethanol precipitation. **Biotechniques**, v.17, p. 274-276, 1994.
- [6] BASHA, S. D. *et al.* A comparative study of biochemical traits and molecular markers for assessment of genetic relationships between *Jatropha curcas* L. germplasm from different countries. **Plant Science**, v. 176, p. 812-823, 2009.
- [7] SUN, Q.B. *et al.* SSR and AFLP markers reveal low genetic diversity in the biofuel plant *Jatropha curcas* in China. **Crop Science**, v. 48, p.1865-1871, 2008.
- [8] HE, W. *et al.* ISSR analyses of genetic diversity of *Jatropha curcas* L. **Chinese Journal of Applied and Environmental Biology**, v. 13, n. 4, p.466-470, 2007.
- [9] REDDY, M.P. *et al.* Genetic improvement of *J. curcas* adaptability and oil yield. In: **FACT SEMINAR ON J. curcas L., AGRONOMY AND GENETICS**, 2007, Wageningen. Wageningrn: FACT Foundation, 2007.

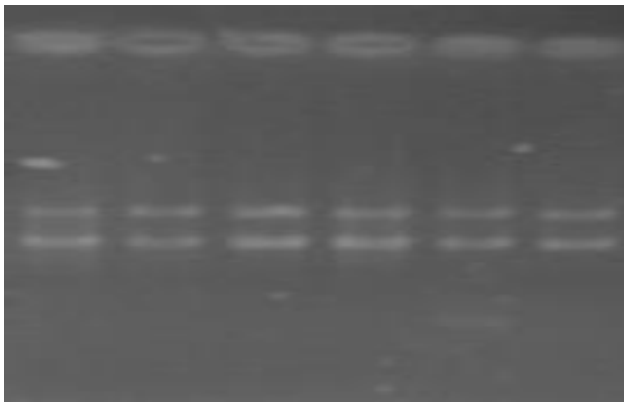


Figura 1: produto de amplificação de genótipos de pinhão manso com o *primer* OPA01.

Tabela 2: Dendrograma dos genótipos de pinhão manso da análise com os *primers* RAPD.

