

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE PINHÃO MANSO (*Jatropha curcas* L.)
CONDUZIDO NA EMBRAPA CLIMA TEMPERADO**

Laura Lemons Moreira¹, Sergio Delmar dos Anjos e Silva², Raquel Bartz Kneib¹, Juliana Castelo Branco Villela³, Juliana Silva Lemões⁴, Natércia Lobato Pinheiro⁵

Resumo: O pinhão manso pode ser considerado uma oleaginosa promissora para a produção de biodiesel. O conhecimento técnico sobre esta planta é limitado e, no Rio Grande do Sul, apesar de existir de forma espontânea e semelhantemente às demais regiões, os estudos são recentes. Um aspecto importante para o estudo de novas espécies, caso do pinhão manso, é a caracterização molecular, utilizada como ferramenta para auxiliar nos programas de melhoramento. Vários trabalhos têm utilizado marcadores microssatélites para a caracterização de genótipos. O uso desta classe de marcadores é bastante útil, pois os locos são os que apresentam maior frequência de mutações em todos os genomas e em todas as espécies animais e vegetais. O presente trabalho teve como objetivo caracterizar plantas de pinhão manso para a identificação da variabilidade genética presente numa coleção conduzida na Embrapa Clima Temperado. Os genótipos avaliados apresentam similaridade variando entre 4% e 97%. A variabilidade genética encontrada nesta coleção é de grande importância para uso no melhoramento genético do pinhão manso, sendo os marcadores de microssatélites eficientes para detectar a variabilidade genética entre os genótipos de pinhão manso.

Termos de indexação: Variabilidade genética, SSR, melhoramento.

Introdução

O pinhão manso é uma planta arbórea da família *Euphorbiaceae* que se destaca como matéria-prima potencial para a produção de biodiesel. Isto se deve ao alto teor de óleo encontrado em suas sementes, até 39,8% (SHAOCHUN et al., 2007), aliado a características físico-químicas do óleo, rusticidade da planta, resistência ao déficit hídrico e ao ataque de pragas, além de ser adaptável a uma vasta gama de condições edafoclimáticas, crescendo inclusive em solos de baixa fertilidade (TEIXEIRA, 2005).

O conhecimento técnico sobre esta planta é limitado (SATURNINO, 2005) e, no Rio Grande do Sul, apesar do pinhão manso existir de forma espontânea e semelhantemente às demais regiões, os estudos são recentes (CASAGRANDE JR. et al., 2007).

No estudo de novas espécies, caso do pinhão manso, um aspecto importante é a caracterização molecular, utilizada como importante ferramenta para auxiliar os programas de melhoramento. Os marcadores moleculares representam ferramentas importantes em diversos estudos, permitindo avaliar, em curto prazo, elevado número de genótipos. Além disso, não sofrem influência ambiental, como ocorre nos marcadores morfológicos que apresentam relativas limitações, especialmente em cultivares proximamente relacionadas. Os marcadores microssatélite ou SSR (*Simple Sequence Repeats*) utilizados na caracterização e avaliação de germoplasma e na identificação de genes de importância agrônômica, têm permitido obter avanços consideráveis nos programas de melhoramento genético de diferentes culturas (PALMIERI & MAIA, 2007).

Visto que o estudo em pinhão manso ainda é recente, é fundamental desenvolver um programa de melhoramento genético para a cultura. Entendendo esta necessidade, a Embrapa Clima Temperado visa estruturar um banco ativo de germoplasma (BAG), selecionando genótipos superiores e separando grupos genotípicos, com o intuito de criar um programa de melhoramento genético de pinhão manso nesta unidade.

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

¹ Estudante, Universidade Federal de Pelotas, E-mail: lauralmoreira@hotmail.com, raquelkneib@yahoo.com.br

² Eng. Agrônomo, Dr., Embrapa Clima Temperado, E-mail: sergio@cpact.embrapa.br

³ Bióloga, Dra., Embrapa Clima Temperado/Bolsista CNPq, E-mail: jvbrancov@hotmail.com

⁴ Química, Mestranda FURG. E-mail: julianalemoes@yahoo.com.br

⁵ Química, Embrapa Clima Temperado, Pelotas RS. E-mail: natercia@cpact.embrapa.br

Apoio financeiro: CNPq, MDA

Material e Métodos

O trabalho foi desenvolvido na Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS. Foram analisados 43 genótipos de pinhão manso de diferentes origens. A extração do DNA foi realizada, segundo o protocolo descrito por Dart (2008), a partir de folhas jovens de plantas conduzidas a campo.

Foram utilizados 12 pares de *primers* (tabela 1), e as reações de amplificação foram desenvolvidas numa reação de 10 µl contendo 5 µl de GoTaq Master Green Mix, 50 ng de DNA e 1,4 µl de *primer Forward* e *primer Reverse* na concentração de 10 µM. A reação de amplificação foi constituída por 30 ciclos com temperatura de anelamento dos primers a temperatura de 52°C. O produto da amplificação foi separado em gel de agarose 3,5% e visualizado em luz ultravioleta por meio de coloração com brometo de etídio.

Tabela 1. *Primers* para locos SSR do genoma de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.), Pelotas, 2009.

<i>Primer</i>	<i>Forward</i>	<i>Reverse</i>
JC01	TCGGTATAGTTCATGCACAG	CCCATCTGATAACCTGGCTAC
JC02	CGAAAAGAAGAACGCCAATC	GGAACCTAAGCTTCAAGACGA
JC07	GATCCTCTGTGAGTGTGGCC	CCCAAGTTATCTCCAAATCC
JC08	TGTCCAACATGATGAGTAGTGCA	GCATTTAGCAGAACCCCGAGA
JC09	GAGGTAGCTGAAAAAACAG	CACAGTTCATACAAAGCCT
JC10	CTATGGGGATTCCAAGACAA	AATCAAATGGGCACTAAAGC
JC13	TTGACTTTTTCTGAGTTCTG	ACAAAAACACACACATTCAA
JC14	AGTACCAACTCCCAAGTTAT	GCTAAAACCTATGGTTCTCTG
JCDS10	CATCAAATGCTAATGAAAGTACA	CACACCTAGCAAACCTACTTGCA
JCDS24	GGATATGAAGTTTCATGGGACAAG	TTCATTGAATGGATGGTTGTAAGG
JCPS06	CCAGAAGTAGAATTATAAATAAA	AGCGGCTCTGACATTATGTAC
JCPS09	GTAAGTATGATCTCTTGTAACTAACAG	TATCTCTTGTTCAGAAATGGAT

As análises de similaridade e de agrupamento dos genótipos foram feitas a partir dos perfis (bandas) revelados pelos 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 Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis for Personal Computers, NTSYS 2.1 (ROHLF, 2000). O dendrograma gerado foi seccionado sobre o valor médio de similaridade, para avaliar os grupos formados.

Resultados e Discussão

Os doze *primers* utilizados no estudo geraram um total de 88 bandas polimórficas, evidenciando a presença de variabilidade genética entre os acessos de pinhão manso analisados e a eficiência da técnica de SSR na detecção de variabilidade genética. Esta eficiência já havia sido relatada por Sun et al. (2008), que utilizou 17 *primers* na caracterização de uma população de pinhão manso da China.

Na Figura 1 verifica-se a separação dos genótipos em cinco grupos de similaridade genética, sendo: I) L1P1, L1P10, L1P2, L1P5, L1P6, L1P7, L1P3, L1P8, L1P9, L1P15, L1P18, L1P4, L1P16, L1P13 e L1P12 II) L2P23, III) L2P1, L2P5, L2P2, L2P4, L2P21, L2P11, L2P13, L2P7, L2P19, L2P9 IV) L3P2, L3P3, L3P4, L3P7, L3P9, L3P6, L3P11, L3P13, L3P8, L3P16, L3P10, L3P18, L3P22, L3P23, L3P20, L3P24 V) L3P1.A Similaridade entre os genótipos variou de 0,04 a 0,97, demonstrando alta variabilidade na população de estudo.

O coeficiente de correlação cofenética do dendrograma ($r=0,95$) revelou alta correspondência entre a representação gráfica da similaridade genética e a matriz de similaridade, o que contribui para a robustez das inferências por meio da avaliação visual da Figura 1.

Além da análise de variabilidade genética por agrupamento, também foi possível verificar que os *primers* JC01, JC07, JC08 e JC13 evidenciaram a presença de indivíduos heterozigotos para a população em estudo.

A variabilidade encontrada no material é muito importante para fins de melhoramento do pinhão manso. Entretanto, para que esta informação a respeito da variabilidade em nível de DNA seja utilizada com eficiência, é necessário que também seja considerada a potencialidade agronômica existente, para que possam ser realizados cruzamentos de interesse.

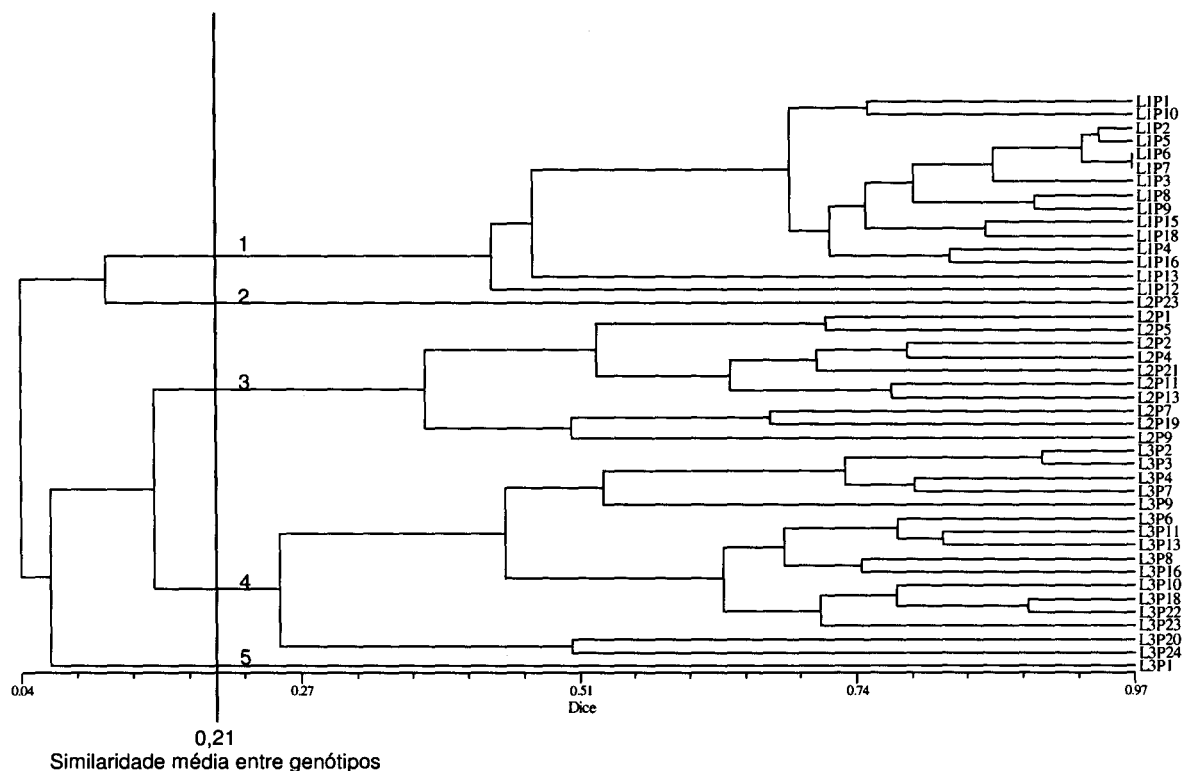


Figura 1. Dendrograma de 43 genótipos de Pinhão manso obtido a partir da análise de microsatélite utilizando o índice de similaridade de DICE (1945) e o método de agrupamento UPGMA. O valor do coeficiente de correlação cofenética (r) é de 0,95. Pelotas, 2009.

Conclusões

Os marcadores microsatélites são eficientes para detectar a variabilidade genética em pinhão manso.

A variabilidade genética encontrada nesta coleção é de grande importância para uso no melhoramento genético do pinhão manso.

Agradecimentos

Os autores agradecem a CNPq e MDA pelos auxílios financeiros recebidos e bolsas de graduação e de pós-graduação, permitindo a viabilização e realização do trabalho.

Referências

CASAGRANDE JÚNIOR, J. G.; SILVA, S. D. dos A. e; AIRES, R. F.; EMYGDIO, B.; Desenvolvimento de mudas de pinhão-manso em condições controladas. In: SIMPÓSIO ESTADUAL DE AGROENERGIA. 2007, Pelotas. **Anais**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2007. 1 CDROM.

DICE, L.R. Measures of the amount of ecological association between species. **Ecology**, Washington, v.26, n.3, p.297-307, 1945.

SUN Q.B.; WU G.J.; GE X.J. SSR and AFLP Markers Reveal Low Genetic Diversit in the biofuel plant *Jatropha curcas* L. in China. **Crop Science**, v.48, 1885-1870, 2008, Medison-USA.

DART. *Diversity Arrays Technology Pty. Ltd.* Disponível em: <http://www.diversityarrays.com/pub/DaRT_DNA_isolation.pdf>. Acesso em: 19 ago. 2008.

PALMIERI, D.A. ; MAIA, L.C. . Marcadores microssatélites 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.

ROHLF, J. NTSYSpc 2.1. Nova Iorque: Applied Biostatistics, 2000. 1 CD-ROM.

SHAO-CHUN, M.; ZHU-YING, L.; CONG, L. Application of biodiesel produced from *Jatropha curcas*

L. seed oil. Zhongguo Youzhi / **China Oils and Fats**, v.32, n.7, p.40-42, 2007.

SATURNINO, H.M.; PACHECO, D.D.; KAKIDA, J.; TOMINAGA, N.; GONÇALVES, N.P. Cultura do pinhão manso (*Jatropha curcas* L.). **Informe Agropecuário**, v. 26, n. 229; p. 44-78, Belo Horizonte, 2005.

TEIXEIRA, L. C. Potencialidades de oleaginosas para produção de biodiesel. **Informe Agropecuário**, v.26, n.229, p.18-27, 2005.