

# DIVERSIDADE GENÉTICA ENTRE ACESSOS DE PINHÃO MANSO POR MEIO DE MARCADORES RAPD E MICROSSATÉLITES

Tatiana Barbosa Rosado<sup>1</sup>, Bruno Galvêas Laviola<sup>2</sup>, Dario Grattapaglia<sup>3</sup>, Leonardo Lopes Bhering<sup>2</sup>, Betânia Quirino<sup>2</sup>, Marília de Castro Rodrigues Pappas, e Danielle Assis de Faria<sup>4</sup>.

## Resumo

Entre as espécies prospectadas para produção de biodiesel, o pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) destaca-se pelo seu alto potencial para produção de óleo. Este trabalho foi realizado com objetivo de verificar a diversidade genética entre 15 acessos de pinhão manso, selecionados do banco de germoplasma da Embrapa Agroenergia, por meio de marcadores RAPD e microssatélites (SSR). Os índices de similaridade entre os acessos foram calculados a partir de 23 locos polimórficos RAPD e 2 locos SSR. A partir dos índices de similaridade as distâncias genéticas entre os acessos foram estimadas e estes agrupados por meio das metodologias de Tocher e UPGMA. A análise dos locos RAPD revelou similaridade média de 0,76 e a dos locos SSR de 0,65. Em ambos marcadores foram formados três grupos distintos pelas metodologias de agrupamento, evidenciando baixa diversidade genética entre os acessos de *Jatropha curcas* avaliados.

## Introdução

O Brasil possui atualmente um programa nacional de produção de biodiesel e para atender a este programa, a Embrapa está desenvolvendo pesquisas com várias espécies oleaginosas. Dentre as espécies oleaginosas o pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) pertencente à família das Euforbiáceas, destaca-se que pelo seu elevado potencial de rendimento de grãos e óleo, por ser uma espécie não alimentar e compatível com perfil da agricultura familiar (CÁRCERES *et al.*, 2008).

A Embrapa Agroenergia possui um banco de germoplasma de acessos de *Jatropha* coletados em diversas regiões do Brasil. Com exceção do local de coleta e informações sobre uma possível origem dos acessos, nada se sabe sobre a diversidade genética destes materiais. O conhecimento da diversidade molecular dos acessos que compõem um banco de germoplasma é um passo fundamental para entender a dimensão e amplitude da variabilidade genética disponível para o avanço e sustentabilidade do processo de ganho genético por seleção no melhoramento. Diversidade molecular estimada com marcadores moleculares neutros fornece uma estimativa rápida e precisa de ancestralidade comum entre acessos, permitindo otimizar os esforços de melhoramento na montagem de populações e planejamento de cruzamentos visando maximizar a segregação e recuperação de genótipos superiores (FERREIRA GRATTAPAGLIA 1998)

Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi verificar a diversidade genética existente entre acessos selecionados do banco de germoplasma da Embrapa Agroenergia com base em marcadores moleculares RAPD e microssatélites.

## Material e Métodos

Foram selecionados, com base na literatura disponível (BASHA *et al.*, 2007; PAMIDIAMARRI *et al.*, 2008; RANADE *et al.*, 2008), 96 primers únicos de RAPD e 6 pares de marcadores microssatélites (SUN, *et al.*, 2008; PAMIDIMARRI *et al.*, 2008) que apresentaram maior potencial de revelar polimorfismo molecular em *Jatropha curcas*. Esses primers foram utilizados em 15 acessos selecionados do banco de germoplasma da Embrapa Agroenergia (Tab.1). Os 15 acessos constituem uma amostra representativa das diferentes regiões do Brasil e foram selecionados visando maximizar a

---

<sup>1</sup> Bolsista de Pós-Doutorado, CNPq. Universidade Federal de Viçosa. E-mail: tatianarosado@yahoo.com.br

<sup>2</sup> Pesquisador, Embrapa Agroenergia, PqEB, Brasília, DF. Email: bruno.laviola@embrapa.br /leonardo.bhering@embrapa.br/betania.quirino@embrapa.br

<sup>3</sup> Pesquisador, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, PqEB, Brasília, DF. E-mail: dario@cenargen.embrapa.br/mariliac@cenargen.embrapa.br

<sup>4</sup> Bolsista de Pós-Doutorado, CNPq. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, E-mail: danyafp@gmail.com

oportunidade de selecionar primers informativos para posterior análise de todo o banco de germoplasma.

O DNA dos acessos foi extraído segundo o protocolo proposto por Ferreira e Grattapaglia (1998), e a concentração final ajustada para 10 ng/ $\mu$ L.

As distâncias genéticas entre os acessos foram estimadas a partir dados moleculares de RAPD e microssatélites pelo coeficiente de similaridade de Jaccard  $a/(n-d)$  em que  $a$  = número de coincidências positivas (tipo 1-1),  $n$  = número total de amostras e  $d$  = número de coincidências negativas (tipo 0-0). Para os dados dominantes de RAPD os estimativas de similaridade foram estimadas a partir dos dados de presença de banda (1) ou ausência (0) e para os dados de microssatélites co-dominantes a descrição genotípica de cada indivíduo foi representada por códigos numéricos (1 a 9) informativos da combinação alélica de cada um.

A partir das informações provenientes das matrizes de distância, foram feitas análises de agrupamentos por meio dos métodos de otimização de Tocher e ligação média entre grupos (UPGMA). Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa Genes (CRUZ, 2009)

## Resultados e Discussão

Os 96 iniciadores RAPD amplificaram 381 locos, dos quais 23 foram polimórficos (6,2%). A matriz de similaridade gerada pelo Índice de Jaccard revelou variação de 0,11 a 1,0 entre os acessos e similaridade média de 0,76. Os menores índices de similaridade foram observados nas comparações do acesso 170 (Minas Gerais) com o acesso 124 (Maranhão) e com o acesso 310 (Pará), cujos índices de similaridade foram de 0,11 e 0,48 respectivamente. Similaridade igual a 1 foi verificada entre os acesso 315 e 261 e entre os acesso 302 e 313 todos originários do México evidenciando a estreita divergência genética entre estes, e sugerindo que esses acessos possam ser réplicas no banco. Similaridade igual a 1 também foi detectada entre acessos de diferentes regiões do Brasil 107 (Minas Gerais) com 101 (Goiás) e 302 (Rio Grande do sul) com 114 (Paraná), demonstrando que a diversidade geográfica não foi sinônimo de divergência genética para esses acessos.

Pelo resultado da hierarquização dos genótipos pelo método UPGMA (Fig.1), ao se adotar um percentual de divergência genética de aproximadamente 56%, constatou-se a formação de três diferentes agrupamentos heteróticos, dos quais um grupo foi unitário constituído pelo acesso 259 o segundo formado pelos acessos 170 e 169 e um terceiro grande grupo constituído pelos demais acessos (Fig.1).

O método de otimização de Tocher resultou em 3 grupos (Tab.1). Os acessos 170, 124 e 259 ficaram em grupos distintos como no método UPGMA e o acesso 310 formou um grupo unitário.

Dos seis pares de iniciadores SSR testados, dois foram polimórficos (Jc06 e Jc41) sendo que para o loco Jc06 todos os acessos foram homozigotos e para o loco J41 seis acessos foram heterozigotos. O número de alelos produzidos nos locos polimórficos foi igual a 2, com tamanhos idênticos aos previamente descritos por Sun *et al.* (2008).

Os valores de similaridade determinados para os marcadores SSR variaram de 0,25 a 1,0 com média de 0,65. Assim como na análise de RAPD o menor índice de similaridade (0,25) foi verificado entre o acesso 170 (Minas Gerais) e o acesso 124 (Maranhão). As metodologias de agrupamento UPGMA (percentual de divergência genética de aproximadamente 80%) e de Tocher, resultaram na formação de três diferentes grupos, dos quais um foi constituído pelos acessos 102 114 e 124 o segundo grupo pelos acessos 170, 313 e 302 e o terceiro pelos demais acessos (figura 2 e tabela 2). Assim como na análise com RAPD os acessos 170, 259 e 124 ficaram em grupos distintos demonstrando a elevada distância genética entre esses.

Os resultados das análises de diversidade genética baseadas em marcadores RAPD e SSR foram similares e revelaram baixa diversidade genética entre os acessos avaliados. Diversidade genética baixa também foi verificada por Sun, *et al* (2008) com marcadores SSR e AFLP em acessos de origem chinesa e por Basha e Sujatha (2007) com marcadores RAPD e ISSR em acessos da Índia. Estes autores justificam que a estreita base genética entre os acessos de J. curcas chineses e indianos é devida as poucas introduções iniciais que se espalharam essencialmente por propagação vegetativa. Neste estudo, era esperado que a diversidade genética entre acessos de diferentes regiões do Brasil fosse elevada. No entanto, isso não foi verificado para os 15 acessos selecionados demonstrando que há uma necessidade imediata de analisar todo o banco de germoplasma para verificar a divergência

dentro de cada região. Caso a mesma tendência seja verificada, acessos de outras regiões do Brasil e do exterior deverão ser introduzidos no banco para que seja alcançado um nível de diversidade adequado para subsidiar o programa de melhoramento desta espécie.

## Conclusões

Os marcadores RAPD e SSR evidenciaram baixa diversidade genética entre os acessos de *Jatropha curcas* avaliados.

## Referências

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, n. 156 p. 375-386. 2007.

CRUZ, C. D (2009) GQMOL: Programa para análise de genética quantitativa molecular. Versão 2009.1.1. Developed by the department of General Biology of Universidade Federal de Viçosa. Available at: [www.ufv.br/dbg/gqmol/gqmol.htm](http://www.ufv.br/dbg/gqmol/gqmol.htm)

FERREIRA, M. E. & GRATTAPLAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análises genéticas. 3. ed. Brasília. EMBRAPA-CERNAGEN, 1998. 220p.

PAMIDIMARRI, D.V.N. S., SINGH, S. MASTAN, S.G. M., PATEL, J., REDDY, M. P. *Molecular characterization and identification of markers for toxic and non-toxic varieties of Jatropha curcas L. using RAPD, AFLP and SSR markers*. Mol., p.10-18. 2008.

RANADE, S. A., SRIVASTAVA, A. P., RANA, T. S., SRIVASTAVA, J., TULI, R. *Easy assessment of diversity in Jatropha curcas L. plants using two single-primer amplification reaction (SPAR) methods*. Science Biomass and Bioenergy, .2007.

SUN, Q. B. Li, L.F., WU, G. J., GE, X. J. *SSR and AFLP markers reveal low genetic diversity in the biofuel plant Jatropha curcas in China*. Crop Science, n.48, p.1865-1870. 2008.

**Tabela 1.** Locais de coleta e origem de acessos do banco de germoplasma de *Jatropha curcas* L.

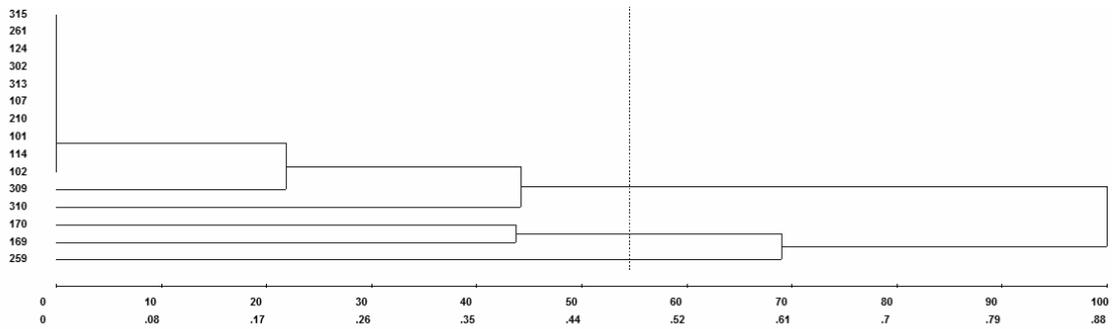
Acesso	Local da coleta	Origem	Acesso	Local de coleta	Origem
124	Santa Inês - MA	Maranhão	259	Sidrolândia - MS	Mato Grosso do Sul
170	Jaíba - MG	Desconhecido	309	Pará	Pará
102	Santa Vitória- MG	Minas Gerais	310	Pará	Pará
101	Rio Verde - GO	Goiás	302	Rio Grande do Sul	Rio Grande do Sul
114	Umuarama - PR	Paraná	313	João Pinheiro	Desconhecida
107	Santa Vitória - MG	Minas Gerais	315	João Pinheiro	Desconhecida
169	Jaíba - MG	Desconhecido	261	João Pinheiro	Desconhecida
210	Lavras-MG	Minas Gerais			

**Tabela 2.** Agrupamento dos acessos definido pelo método de Tocher para marcadores RAPD

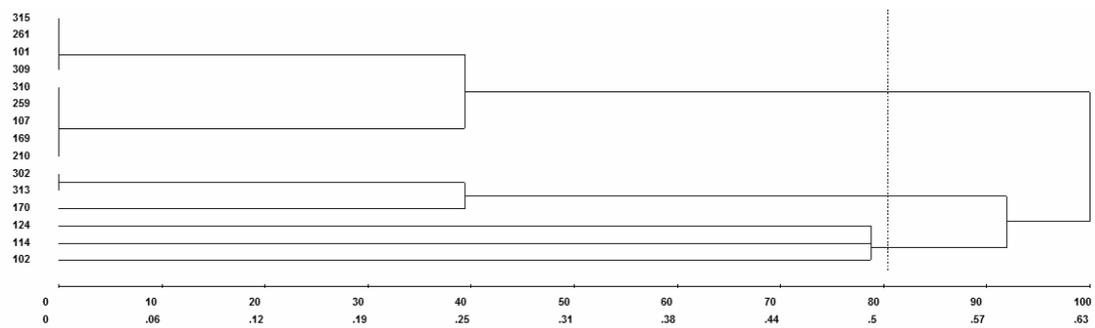
Grupo	Acessos
1	124 102 101 114 107 210 259 309 302 313 315 261
2	170 169
3	310

**Tabela 3.** Agrupamento dos acessos definido pelo método de Tocher para marcadores SSR

Grupo	Acessos
1	101 107 169 210 310 259 309 315 261
2	170 302 313
3	102 114 124



**Figura 1.** Dendrograma gerado pelo método UPGMA a partir da matriz de similaridade baseado em marcadores RAPD



**Figura 2.** Dendrograma gerado pelo método UPGMA a partir da matriz de similaridade baseado em marcadores SSR