

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ACESSOS DE PINHÃO MANSO DO BANCO DE GERMOPLASMA DA EMBRAPA AGROENERGIA

Tatiana Barbosa Rosado L, UFV, tatianarosado@yahoo.com.br

Bruno Galvêas Laviola, Embrapa Agroenergia, bruno.laviola@embrapa.br

Dario Grattapaglia, CENARGEN, dario@cenargen.embrapa.br

Leonardo Lopes Bhering, Embrapa Agroenergia, leonardo.bhering@embrapa.br

Betânia Quirino, Embrapa Agroenergia, betania.quirino@embrapa.br

Marília de Castro Rodrigues Pappas, CENARGEN, mariliac@cenargen.embrapa.br

RESUMO: Este estudo foi realizado com o objetivo de determinar a diversidade genética entre acessos de pinhão manso componentes do banco de germoplasma da Embrapa Agroenergia, visando sua utilização em futuros trabalhos de seleção. Foram avaliados 192 acessos provenientes de diversas regiões do Brasil. Os índices de similaridade entre os acessos foram calculados a partir de 23 locos polimórficos RAPD. 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 0,89. Três grupos distintos foram formados pelas metodologias de agrupamento, evidenciando estreita base genética entre os acessos de *Jatropha curcas* avaliados. Os dendrogramas gerados neste estudo dão subsídios para futuros cruzamentos de gerações parentais contrastantes ou similares no melhoramento de *Jatropha curcas*.

PALAVRAS CHAVE: Diversidade genética, RAPD, Marcador molecular, *Jatropha curcas*.

INTRODUÇÃO

. O pinhão manso (*Jatropha curcas* L), pertencente à família Euphorbiaceae, é um arbusto perene, nativo provavelmente da América Central e amplamente presente em toda a América central, África e Ásia (Basha, et al., 2009). Tradicionalmente, sementes de *Jatropha* e outras partes das plantas foram utilizadas para produção de óleo, sabão e medicamentos diversos (Kohli, et al., 2009). No entanto, a sua recente popularidade deve-se ao potencial do óleo de seus grãos como fonte de biodiesel. *Jatropha* é uma das únicas entre as fontes de energia renováveis que não compete com a cultura alimentar e é compatível com perfil da agricultura familiar (Cárceres et al., 2008). O rendimento potencial de *Jatropha* varia de 2 a 5 toneladas/ha (ano ha) - dependendo do solo, nutrientes e condições de precipitação (Francis, et al., 2005). As sementes contêm 30-35% de óleo que pode ser convertido por transesterificação em biodiesel com boa/alta qualidade (Basha et al., 2009).

Apesar das inúmeras vantagens de *J. curcas*, uma série de fatores devem ser solucionados para completa domesticação da espécie. Dentre esses fatores o conhecimento da dimensão e amplitude da variabilidade genética disponível é essencial para o avanço e sustentabilidade do processo de ganho genético por seleção no melhoramento.

Normalmente, a diversidade genética de uma espécie é armazenada em bancos de germoplasma que são fundamentais, pois permitem ao melhorista obter genes/alelos, a serem incorporados aos trabalhos de melhoramento genético além de evitar a erosão genética (Bueno et al., 2001). Diante disso, a Embrapa Agroenergia constituiu 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. 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 determinar a diversidade genética existente entre acessos do banco de germoplasma da Embrapa Agroenergia com base em marcadores moleculares RAPD visando sua utilização em futuros trabalhos de melhoramento genético .

MATERIAL E MÉTODOS

Um conjunto de 192 acessos de pinhão manso componentes do banco de germoplasma da Embrapa Agroenergia, de diferentes regiões do Brasil foram utilizados . O DNA genômico

total foi extraído de um conjunto de folhas de plantas jovens para cada um dos acessos segundo o protocolo proposto por Ferreira & Grattapaglia (1998). A quantificação de DNA foi realizada utilizando-se espectrofotômetro NanoDrop, da Thermo Scientific e a concentração final ajustada para 10 ng/μL.

A reação da polimerase em cadeia (PCR) para o marcador de polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (RAPD) foi baseada no protocolo descrito por Ferreira & Grattapaglia (1998). O volume final de reação, de 13 μL, foi composto de 3,0 μL da solução de DNA (10 ng/μL), 1,3 μL de tampão PCR 10X, 0,4 μL de MgCl₂ (50 mM), 1,04 μL de 10 mM de dNTP mix contendo 2,5 mM de cada um dos quatro nucleotídeos (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), 2 μL de *primer* (10 ng/μL), 0,2 μL de *Taq* DNA polimerase (5 U/μL) água MiliQR esterilizada para completar o volume.

Foram selecionados, com base na literatura disponível (Basha et al., 2007; Pamidimarri et al., 2008a; Pamidimarri et al., 2008b; Ranade et al., 2008), 96 primers únicos de RAPD que apresentaram maior potencial de revelar polimorfismo molecular em *Jatropha*. As condições de amplificação de RAPD seguiram o protocolo de Ferreira & Grattapaglia (1998) que consistiu de 40 ciclos de amplificação de 1 minuto a 92°C, 1 minuto a 35°C e 2 minutos a 72°C; 5 minutos a 72°C e, finalmente, de temperatura constante de 4°C para conservação do produto da reação até a retirada das amostras do aparelho. O produto da reação foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 1,5% com brometo de etídio (0,4 μL/mL) submerso em tampão SB 1X a uma corrente de 130V por 4 horas. Os géis foram fotografados sob luz ultravioleta e os fragmentos das amostras determinados por comparação a um padrão de 100 pb (Invitrogen) utilizando-se o programa Kodak EDAS 290 (*Electrophoresis and Analysis System*).

As distâncias genéticas entre os acessos foram estimadas a partir dados moleculares de RAPD 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). A partir das informações provenientes das matrizes de distância, foram feitas análises de agrupamentos por meio dos métodos de otimização de Tocher, ligação média entre grupos (UPGMA) e projeção de distância em espaço bidimensional. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa GENES (Cruz, 2009).

Tabela 1. Origem geográfica dos acessos de J. Curcas do banco de germoplasma

Acesso	Origem Geográfica	Acesso	Origem Geográfica	Acesso	Origem Geográfica
1	Rio Verde-GO	65	Plantio comercial-Jaiba-MG*	129	Arinos-MG
2	Santa Vitoria-MG	66	Plantio comercial-Jaiba-MG*	130	Arinos-MG
3	Santa Vitoria-MG	67	Plantio comercial-Jaiba-MG*	131	Minas Gerais
4	Santa Vitoria-MG	68	João Pinheiro-MG	132	Minas Gerais
5	Santa Vitoria-MG	69	João Pinheiro-MG	133	Minas Gerais
6	Santa Vitoria-MG	70	João Pinheiro-MG	134	Minas Gerais
7	Santa Vitoria-MG	71	João Pinheiro-MG	135	Minas Gerais
8	Santa Vitoria-MG	72	João Pinheiro-MG	136	Minas Gerais
9	Santa Vitoria-MG	73	João Pinheiro-MG	137	Minas Gerais
10	Santa Vitoria-MG	74	João Pinheiro-MG	138	Arinos-MG
11	Petrolina-PE	75	João Pinheiro-MG	139	Arinos-MG
12	Sete Lagoas-MG	76	João Pinheiro-MG	140	Minas Gerais
13	Umuarama-PR	77	João Pinheiro-MG	141	Minas Gerais
14	Xambrê-PR	78	João Pinheiro-MG	142	Minas Gerais
15	S. Jose dos Campos-SP	79	Plantio comercial-Jaiba-MG*	143	Minas Gerais
16	S. Franc. do Gloria-MG	80	Pelotas-RS	144	Minas Gerais
17	Curvelo-MG	81	Pelotas-RS	145	Minas Gerais

18	Guapimirim-RJ	82	Pelotas-RS	146	Minas Gerais
19	Bom Jesus-RJ	83	Pelotas-RS	147	Minas Gerais
20	Belmiro Braga-MG	84	Curvelo-MG	148	Minas Gerais
21	Belmiro Braga-MG	85	Sete Lagoas-MG	149	Minas Gerais
22	Maranhão	86	Curvelo-MG	150	Uberlandia-MG
23	Maranhão	87	S. Franc. de Assis-RS	151	Uberlandia-MG
24	Maranhão	88	BAG-UFLA-Lavras-MG*	152	Uberlandia-MG
25	Maranhão	89	BAG-UFLA-Lavras-MG*	153	Plantio comercial-Anápolis-GO*
26	Maranhão	90	BAG-UFLA-Lavras-MG*	154	Jales-SP
27	Maranhão	91	BAG-UFLA-Lavras-MG*	155	Jales-SP
28	Maranhão	92	BAG-UFLA-Lavras-MG*	156	Porangatu-GO
29	Maranhão	93	BAG-UFLA-Lavras-MG*	157	Porangatu-GO
30	Maranhão	94	BAG-UFLA-Lavras-MG*	158	BAG-CPAO - Dourados-MS
31	Maranhão	95	BAG-UFLA-Lavras-MG*	159	BAG-CPAO-Dourados-MS
32	Maranhão	96	BAG-UFLA-Lavras-MG*	160	Minas Gerais
33	Maranhão	97	BAG-UFLA-Lavras-MG*	161	Minas Gerais
34	Maranhão	98	BAG-UFLA-Lavras-MG*	162	Minas Gerais
35	Maranhão	99	BAG-UFLA-Lavras-MG*	163	Minas Gerais
36	Maranhão	100	BAG-UFLA-Lavras-MG*	164	Minas Gerais
37	Maranhão	101	BAG-UFLA-Lavras-MG*	165	Minas Gerais
38	Maranhão	102	BAG-UFLA-Lavras-MG*	166	Minas Gerais

39	Maranhão	103	BAG-UFLA-Lavras-MG*	167	Minas Gerais
40	Maranhão	104	BAG-UFLA-Lavras-MG*	168	Minas Gerais
41	Maranhão	105	BAG-UFLA-Lavras-MG*	169	Minas Gerais
42	Maranhão	106	BAG-UFLA-Lavras-MG*	170	Minas Gerais
43	Maranhão	107	BAG-UFLA-Lavras-MG*	171	Minas Gerais
44	Maranhão	108	BAG-UFLA-Lavras-MG*	172	Minas Gerais
45	Candeias-BA	109	Ribeirão Preto-SP	173	Minas Gerais
46	Paraná	110	S. Franc. do Gloria-MG	174	Minas Gerais
47	Janaúba-MG	111	S. Miguel do Araguaia-GO	175	Minas Gerais
48	Janaúba-MG	112	S. Miguel do Araguaia-GO	176	Minas Gerais
49	Janaúba-MG	113	S. Miguel do Araguaia-GO	177	Minas Gerais
50	Janaúba-MG	114	S. Miguel do Araguaia-GO	178	Minas Gerais
51	Janaúba-MG	115	Paraná	179	Sertanópolis-PR
52	BAG-EPMIG-Nova Porteirinha-MG	116	Paraná	180	Sidrolandia-MS
53	BAG-EPMIG-Nova Porteirinha-MG	117	Paraná	181	Rio Grande do Sul
54	BAG-EPMIG-Nova Porteirinha-MG	118	Paraná	182	Rio Grande do Sul
55	BAG-EPMIG-Nova Porteirinha-MG	119	São Francisco do Glória-MG	183	Rio Grande do Sul
56	BAG-EPMIG-Nova Porteirinha-MG	120	Agua de Santa Bárbara-SP	184	Rio Grande do Sul
57	BAG-EPMIG-Nova Porteirinha-MG	121	Agua de Santa Bárbara-SP	185	Campina Grande-PB
58	BAG-EPMIG-Nova Porteirinha-MG	122	Agua de Santa Bárbara-SP	186	Campina Grande-PB
59	BAG-EPMIG-Nova Porteirinha-MG	123	Barra dos Bugres-MT	187	Campina Grande-PB

60	Nova Porteirinha-MG	124	Barra dos Bugres-MT	188	Campina Grande-PB
61	Nova Porteirinha-MG	125	Petrolina-PE	189	Pará
62	Nova Porteirinha-MG	126	Apucarana-PR	190	Pará
63	Nova Porteirinha-MG	127	Apucarana-PR	191	Plantio comercial-MG*
64	Janaúba-MG	128	Pirassununga-SP	192	Plantio comercial-MG*

* Origem real desconhecida.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os 96 iniciadores RAPD amplificaram 381 locos, dos quais 23 foram polimórficos (6,2%). Os locos polimórficos foram amplificados por 13 iniciadores, com média de 1,9 e amplitude de 1 a 4 locos polimórficos por iniciador. A matriz de similaridade gerada pelo Índice de Jaccard revelou variação de 0,14 a 1,0 entre os acessos e similaridade média de 0,89 comparável a média de similaridade obtida por Sun et al. (2008) em genótipos de *J. curcas* da China. Esses autores verificaram similaridade média de 0,92 entre os genótipos chineses por meio de marcadores AFLP.

Os menores índices de similaridade foram observados nas comparações do acesso 65 (Minas Gerais) com o acesso 1 (Maranhão) e com o acesso 153 (Góias), cujos índices de similaridade foram de 0,11 e 0,35 respectivamente. Similaridade igual a 1 foi verificada entre vários acessos da mesma região, como 3 e 7 (Santa Vitória), 144 e 148 (Minas Gerais), 120 e 122 (Águas de Santa Bárbara), 150 e 152 (Uberlândia), 183 e 184 (Rio Grande do Sul), 187 e 188 (Campina Grande), sugerindo que esses acessos possam ser réplicas no banco de germoplasma.

Pelo resultado da hierarquização dos genótipos pelo método UPGMA (figura 1), ao se adotar um percentual de divergência genética de aproximadamente 76% constatou-se a formação de três diferentes agrupamentos heteróticos, dos quais um grupo foi unitário constituído pelo acesso 153 o segundo formado pelos acessos 66, 67, 65 e 79 e o terceiro grande grupo constituído pelos demais acessos. A projeção de distância apresentou padrões semelhantes de agrupamento àquele definido pelo método UPGMA (figura 2).

O método de otimização de Tocher resultou em 7 grupos (tabela 1). O acesso 153 formou um grupo unitário como no método UPGMA e na projeção de distância, mas diferentemente do UPGMA, o acesso 79 ficou em um grupo distinto dos acessos 66, 67 e 65. Estes acessos foram coletados em plantios comerciais e não são conhecidas as verdadeiras origens, tendo indicativos que possam ser de introduções mais recentes. Os outros 184 acessos (94%) formaram um grande grupo. O grupo maior foi composto por acessos de diferentes origens enquanto que, em alguns casos acessos de mesma origem ficaram em grupos distintos, como os acessos 166 (grupo 6) e 165 (grupo 7) de Porteirinha e os acessos 153 (grupo 5) e 79 (grupo 4) de Jaíba. Esses resultados evidenciam claramente que acessos de diferentes regiões do Brasil possuem uma ancestralidade comum, não existindo portanto, diversidade por origem. Resultados semelhantes foram observados no estudo de diversidade

genética realizado por Basha et al. (2007) em genótipos de diferentes regiões da Índia. A partir de marcadores RAPD e ISSR estes autores verificaram que de 43 genótipos 83% foram agrupados em dois grandes grupos, indicando que também na Índia a diferença geográfica não é sinônimo de divergência genética.

A baixa diversidade genética entre os acessos de pinhão manso das diferentes regiões do Brasil pode ser justificada por poucas introduções iniciais em séculos passados, provavelmente por portugueses durante a colonização, que se espalharam predominantemente por propagação vegetativa. Basha et al. (2009) 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.

A baixa diversidade verificada neste estudo via marcador molecular neutro, não confirma inexistência de variação associada a caracteres de herança complexa. Assim, os diferentes agrupamentos heteróticos formados podem de imediato orientar cruzamentos de gerações parentais contrastantes ou convergentes no programa de melhoramento de *Jatropha curcas*. No entanto, visando sustentar ganhos genéticos contínuos em médio/longo prazo é essencial enriquecer o banco de germoplasma com acessos de outros países, principalmente, do centro origem e/ou diversidade da espécie.

Tabela 2. Agrupamento dos 192 acessos de pinhão manso definidos pelo método de Tocher para marcadores RAPD.

GRUPOS	ACESSOS
1	2 15 25 26 31 34 35 37 42 46 47 51 55 56 58 70 71 72 74 75 80 86 108 109 160 7 9 11 13 20 27 30 33 39 43 44 50 52 59 60 61 62 68 77 83 87 89 100 101 103 127 128 3 10 82 93 121 124 78 1 8 63 120 138 142 113 114 122 134 32 91 92 97 12 18 22 24 28 29 96 98 99 104 116 131 139 143 146 151 155 157 158 181 5 6 85 125 129 130 133 23 57 84 95 136 179 4 17 41 53 64 76 105 106 107 115 132 141 150 152 154 156 111 94 36 54 90 162 140 118 88 102 144 148 163 167 168 170 172 173 174 175 183 184 185 186 189 191 126 112 123 16 149 187 188 159 117 119 161 190 192 137 182 81 14 21 69 180 145 171 178 45 177 49 40 73 110 147 169 19 164 48
2	135 176 38
3	66 67 65
4	79
5	153
6	166
7	165

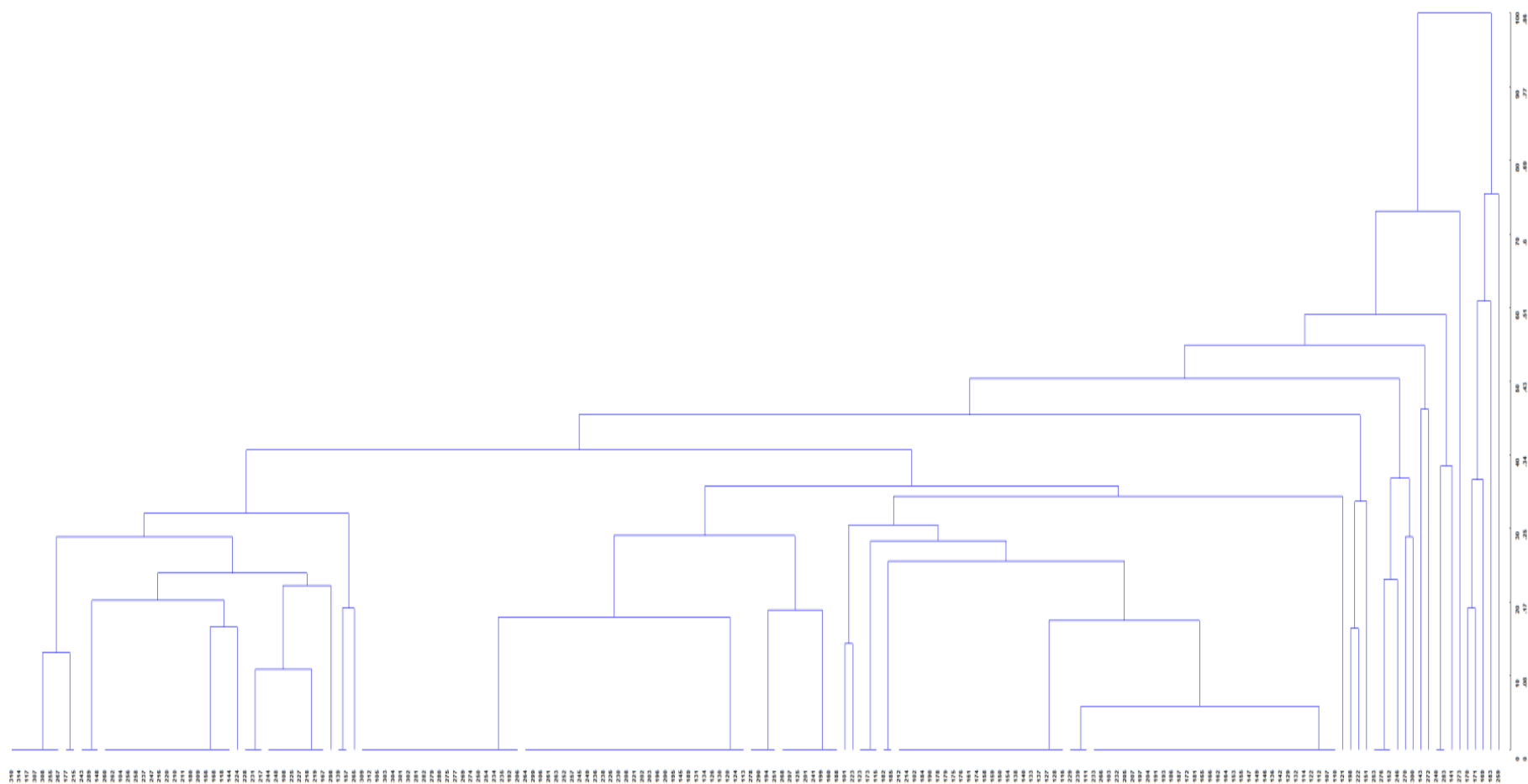


Figura 1. Dendrograma gerado pelo método UPGMA, a partir das similaridades dos 192 genótipos de pinhão manso baseados em marcadores RAPD

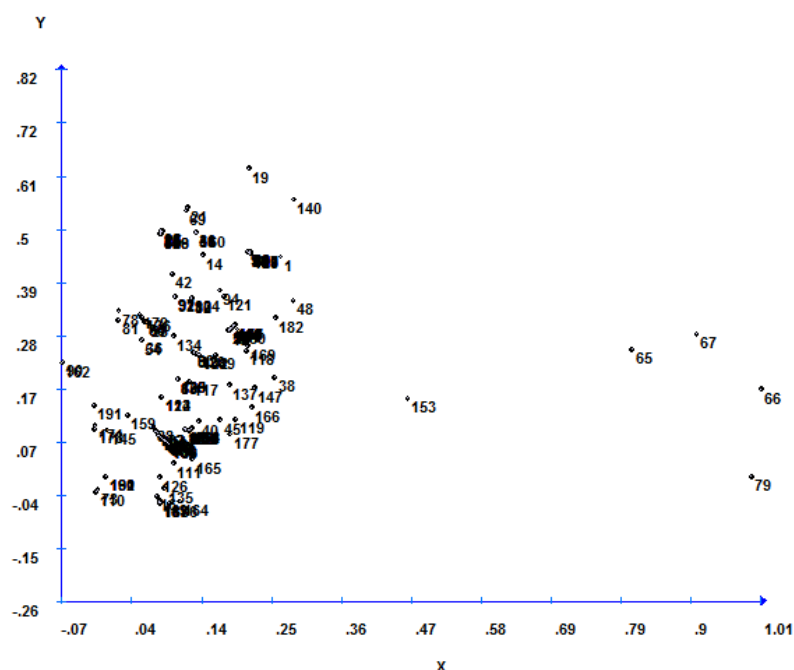


Figura 2. Gráfico gerado pelo método de projeção de distância a partir das similaridades dos 192 genótipos de pinhão manso baseados em marcadores RAPD

CONCLUSÕES

A análise multivariada pelos métodos UPGMA e Tocher baseada em marcadores RAPD revelou diversidade genética baixa entre os acessos de *Jatropha curcas* componentes do banco de germoplasma da Embrapa agroenergia.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa concedida; Aos produtores, empresas e pesquisadores pela fundamental contribuição nas atividades de prospecção e coleta dos acessos de pinhão manso.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BASHA, S. D., FRANCIS, G., MAKAR, H.P.S., BECKER, K., SUJATHA, M. A comparative study of biochemical traits and molecular markers for assessment of genetic relationships between *Jatropha curcas* L. germplasm from different countries E Plant Science, n. 176 p. 812-823. 2009.

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.

BUENO, L. C. DE S.; MENDES, A. N.G.; CARVALHO, S. P. DE. **Melhoramento genético de plantas.** Minas Gerais: Editora UFLA, 2001.

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

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

FRANCIS, G., EDINGER, R., BECKER, K. **A concept for simultaneous wasteland reclamation, fuel production, and socio-economic development in degraded areas in India: need, potential and perspectives of *Jatropha* plantations,** *Nat. Resour. Forum* 29 (2005) 12–24.

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.