



DIVERGÊNCIA GENÉTICA ESTIMADA POR MEIO DE MARCADORES MOLECULARES ISSR EM ACESSOS DE *JATROPHA CURCAS* L.

Pedro Thiago Medeiros Paixão, Anunciene Barbosa Duarte, Francielle de Matos Feitosa, Renata Aparecida Neres Faria, Joseilton faria Silva, Poliana Soares da Cruz Mascarenhas, Silvia Nietsche

Introdução

O pinhão-mansão (*Jatropha curcas* L.) é uma oleaginosa que tem despertado o interesse de produtores, governos e instituições de pesquisa, visando ao desenvolvimento de tecnologia que possibilite sua utilização como cultura agroenergética. Esta espécie, da família das euforbiáceas, é encontrada de forma dispersa, adaptando-se a condições edafoclimáticas das mais variáveis e com forte resistência à seca, produz, no mínimo, duas toneladas de óleo por hectare/ano [1].

Estudos da variabilidade genética de uma população são importantes para melhoristas de plantas, pois auxiliam na caracterização de acessos, além de facilitar na seleção de parentais para cruzamentos direcionados. Segundo Dias *et al.* [2] é razoável supor que a região do norte de Minas Gerais possa ser um importante centro de diversidade do pinhão-mansão, em função da elevada variabilidade observada em caracteres agrônômicos da espécie nessas condições.

A seleção de genitores para os programas de melhoramento e o manejo da variabilidade nos bancos de germoplasmas depende da disponibilidade de informações precisas sobre o grau de divergência genética entre os acessos.

Diversas técnicas de biologia molecular estão disponíveis atualmente para detecção de polimorfismo genético diretamente em nível de DNA, auxiliando na avaliação das relações genéticas entre genótipos. Os marcadores moleculares fornecem um alto grau de polimorfismo, são distribuídos aleatoriamente ao longo de todo o genoma e por serem praticamente livres de efeitos ambientais e estádios fisiológicos das plantas, permitem uma identificação precoce e precisa dos genótipos de interesse [3].

Os marcadores moleculares ISSR representam uma das classes mais recentes e foi desenvolvida a partir da necessidade de explorar repetições microssatélites sem a utilização de sequenciamento do DNA [4]. São facilmente detectados usando poucos equipamentos, são bastante variáveis e fornecem grande número de dados por um custo razoável para o pesquisador [5].

Destarte, o objetivo do trabalho foi avaliar a diversidade genética de nove acessos de *Jatropha curcas*, utilizando marcadores moleculares ISSR.

Material e métodos

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Biotecnologia, da Universidade Estadual de Montes Claros - Unimontes. Foram analisados nove acessos de pinhão manso, sendo eles identificados como indivíduos 43, 70,90,101,104,155,157,174 e 175. Para a extração do DNA genômico foram retiradas folhas jovens coletadas de plantas mantidas no banco de germoplasma da Unimontes. Estas, após coletadas, foram depositadas em envelopes de papel alumínio devidamente identificados, acondicionadas em caixa de isopor, as quais foram encaminhadas ao laboratório, no qual foram armazenadas a -80 °C até que se procedesse a extração do DNA. A extração de DNA foi realizada utilizando-se o método proposto por [6].

Após a obtenção de uma solução contendo DNA, a concentração do mesmo foi estimada por espectrofotometria por leitura da absorbância a 260 nm e 280 nm. Cada unidade de absorbância correspondeu a uma concentração de 50 µg/mL de DNA fita dupla [7]. A relação A_{260}/A_{280} foi utilizada para avaliar a pureza do DNA. A integridade do DNA foi determinada em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídeo e fotografado sob luz ultravioleta, em sistema digital UPV Life Science Software.



Após a quantificação, a concentração do DNA de cada amostra foi padronizada para 10ng/μL e submetidas à técnica de ISSR. Para as amplificações foram utilizados um volume final por reação de 10 μL DNA (25ng); 1μL Tris-HCl pH 8,3 (10 mM/50 mM); MgCl₂(25 mM); dNTPs (0,2 μM); *primer* (0,4 μM); Taq DNA polimerase (0,6 unidades) e água ultrapura para completar o volume de 10 μL. As amplificações foram realizadas em termociclador Eppendorf, modelo Biocycler, uma fase inicial de desnaturação a 94 °C por 4 minutos, seguida por 35 ciclos de desnaturação (94 °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 °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 *primers* utilizados para a amplificação foram da coleção UBC (*Primers* desenvolvidos pelo Laboratório de Biotecnologia da Universidade Columbia Britânica, coleção nº 9) tomados ao acaso, sendo eles UBC: 812, 873, 847, 866, 817, 833 e 889. Os produtos resultantes das amplificações foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,2%, a 100 V, em tampão TBE 1X por uma hora e corados em solução de brometo de etídeo a 0,2 mg/L por 15 minutos. Os fragmentos amplificados também foram visualizados sob luz ultravioleta e fotografados.

A análise foi 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 dendrograma foi obtida pelo programa R (R Development Core Team, 2006).

Resultados e Discussão

Todas as amostras de DNA de pinhão manso utilizados apresentaram quantidade e qualidade satisfatórias para análise de diversidade genética das mesmas.

O uso dos marcadores moleculares ISSRs permitiu observação média de cinco fragmentos monomórficos por *primer* variando entre 4 (UBC 889 e 847) a sete (UBC 833 e 866). Todos os *primers* amplificaram e mostraram um bom padrão de amplificação, amplificando regiões comuns para os indivíduos testados no presente estudo. O tamanho dos fragmentos amplificados variou de 700 a 1000 pb, aproximadamente.

A partir da obtenção da matriz binária, onde a presença de banda foi considerado 1 e ausência 0, foi realizada a análise de diversidade genética entre as nove variedades de pinhão manso e constituída uma matriz de distância genética. As distâncias genéticas observadas variaram de 0,10 a 0,35 % entre as variedades, sendo o valor médio de 0,23%.

Por meio da análise de agrupamento e construção do dendrograma com as distâncias genéticas relativas, verificou-se a presença de dois grupos distintos (figura 1). O primeiro grupo foi o que concentrou o maior número de indivíduos, sendo eles o 157, 175, 104, 174,70 e 90 e o segundo, formado pelos indivíduos 43, 101 e 155. Estes resultados indicam a proximidade genética dos indivíduos testados no presente trabalho o que pode estar atribuído ao provável origem já que todos foram oriundos de um mesmo local, uma vez que [6] avaliaram a extensão da diversidade genética em um conjunto representativo de quarenta e dois acessos de *J. curcas* abrangendo diferentes zonas agroclimáticas 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. Um outro fator que deve ser ressaltado é que ainda são realizados poucos estudos genéticos com esta espécie, estando sua diversidade muito limitada. Basha *et al.* [8] 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. Em contra partida He *et al.* [9] usando marcador ISSR relatou alto nível de diversidade genética entre oito populações de *J. curcas*.

Santos [10], utilizando cinco iniciadores ISSR (VBV (AC)7, BDB (CA)7, HBH (CT)7, GCV (TC)7, BDV (AG)7) observou a formação de 5 grupos demonstrando as relações genéticas entre 48 genótipos de *Jatropha* analisados, sendo 46 genótipos de *J. curcas*, um genótipo de *J. podagrica* e um genótipo *J. molissima*, detectando estreita variabilidade genética nesta coleção de pinhão-manso.

Conclusão



Os genótipos de pinhão manso avaliados apresentam baixa variabilidade genética por meio dos marcadores ISSR.

Referências

- [1] CARNIELLI, F. O combustível do futuro. Disponível em: <www.ufmg.br/boletim/bul1413.2003> Acesso em: julho de 2015.
- [2] DIAS, L. A. S.; MISSIO, R. F.; DIAS, D. C. F. S. Antiquity, botany, origin and domestication of *Jatropha curcas* (Euphorbiaceae), a plant species with potential for biodiesel production. *Genetics and Molecular Research*, Ribeirão Preto, v.11, n. 3, p. 2719-2728, May/June 2012.
- [3] PAZETO, MARIANA SILVA ROSA. Estudo da diversidade genética em acessos de *Jatropha* spp. Por meio de caracteres morfológicos e marcadores moleculares ISSR. /Mariana Silva Rosa Pazeto. – Jaboticabal, 2013.
- [4] ZIETKIEWICZ, *et al.* Genome fingerprinting by Simple Sequence Repeat (ssr)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, v.20: p.173-183, 1994.
- [5] WOLFE, A. D. 2005. ISSR techniques for evolutionary biology. *Methods Enzimol.* n. 395, p. 134-144.
- [6] BASHA, S. D.; SUJATHA, M. Inter and intra-population variability of *Jatropha curcas* L. characterized by RAPD and ISSR marks and development of population-specific SCAR markers, *Euphytica*, v. 156, p. 375-386, 2007.
- [7] SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [8] 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.
- [9] 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.
- [10] SANTOS, DALILHIA NAZARÉ DOS. Caracterização genética de pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) por meio de citometria de fluxo e marcadores moleculares / Dalilhia Nazaré dos Santos. – Lavras : UFLA, 2012.84 p. : il.

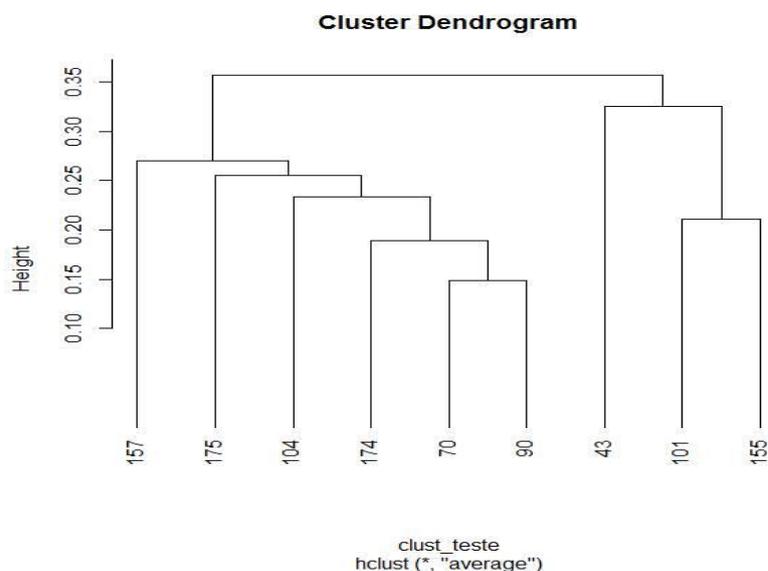


Figura 1: Dendrograma de genótipos de pinhão manso da análise com *primers* ISSR.