

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ACESSOS DE PINHÃO MANSO (*Jatropha curcas* L.) DO MUNICÍPIO DE PIRACURUCA, PIAUÍ

Luzirene Almeida (ICV/UFPI), Francilene Leonel Campos (orientadora - Licenciatura em Ciências Biológicas, Campus Parnaíba-UFPI)

Introdução

Atualmente a busca por fontes de energia renováveis, em substituição dos combustíveis fósseis tem crescido em larga escala aumentando os estudos por vegetais que possam ter viabilidade para produção de biodiesel e isso tem revelado o potencial de muitas plantas produtoras de sementes oleaginosas, como no caso do pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) que vem se destacando como uma das culturas candidatas mais promissoras para se produzir biodiesel, sendo uma planta perene, cultivável sob condições de solo e clima mais variados, incluindo o semiárido (ARRUDA *et al.*, 2004), além de apresentar rápido crescimento, fácil propagação, baixo custo de sementes e elevado teor de óleo (SUJATHA *et al.*, 2008).

Em virtude do pouco tempo de domesticação da espécie, ainda não foram desenvolvidas cultivares de pinhão manso, existe falta de informações tecnológicas, tanto agrônômicas como genética, tornando seu conhecimento limitado. Existem poucos resultados em pesquisa científica com esta oleaginosa. Ainda não há sementes certificadas e melhoradas que garantam aumento de produtividade. Tal fato impulsiona a implantação de um programa de melhoramento genético para a cultura, principalmente no Piauí onde essa espécie é cultivada em pequena escala.

Uma das maneiras de se conhecer uma espécie é estudando a sua diversidade genética através de características fenotípicas e moleculares. Estas informações são muito importantes para a conservação e melhoramento genético desta espécie. Um aspecto importante no estudo de novas espécies, caso do pinhão manso, é a caracterização molecular, utilizada como importante ferramenta para auxiliar os programas de melhoramento usando os marcadores moleculares, os quais têm permitido obter avanços consideráveis nos programas de melhoramento genético de diferentes culturas (PALMIERI & MAIA, 2007). Diferentes tipos de marcadores moleculares encontram-se disponíveis para a detecção da variabilidade genética a nível de DNA, visando a detecção de polimorfismo genético.

Dentre eles, os marcadores RAPD (*Random Amplified Polymorphism DNA*) têm sido muito utilizados para caracterização e avaliação da variabilidade genética em diversas culturas. Esse marcador é considerado ideal para a compreensão de padrões de fluxo gênico e parentesco, além de permitir uma amostragem extensiva do genoma de interesse com relação a DNA, sem influência do ambiente, e gerando uma grande quantidade de caracteres adicionais (GRATTAPLAGLIA, 2001).

Em relação ao avanço conhecimento científico e tecnológico, a identificação destes genótipos adaptado a região de estudo, permitirá o desenvolvimento de variedades de pinhão manso específicas para os sistemas de produção e para uma provável industrialização do biodiesel.

O presente estudo tem como objetivo a análise molecular de acessos de *Jatropha curcas* L. do município de Piracuruca, Piauí, utilizando marcadores RAPD.

Metodologia

3.1 Coleta de amostras de pinhão manso

Foram coletados folhas jovens de 20 genótipos de pinhão-manso, 12 provenientes do Lote Ecodísio, e 8 provenientes do Lote Rio Pardo, sendo implantados para cultivo em Março de 2010, na Fazenda Carnaúba, município de Piracuruca no estado do Piauí (03°55'41"S e 41°42'33"W). As folhas foram retiradas do ápice, e colocadas em vidrarias devidamente identificadas contendo gel para coleta (CTAB) e, em seguida foram acondicionadas em geladeiras para posteriores extrações. Dentre esses 20 acessos foram escolhidos apenas as amostras P e U (tabela 1), visto que, foi realizado apenas um teste de primers nesse estudo.

Tabela 1- Genótipos de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) utilizado no estudo.

Amostra	Descrição
P	LOTE-RIO PARDO-2010
U	LOTE-RIO PARDO-2010

3.2 RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)

A. Extração de DNA e análise de RAPD

O DNA genômico das folhas foi extraído utilizando-se o método proposto por DOYLE e DOYLE, 1987, com modificações.

Para a análise de RAPD as reações de amplificação seguiram a metodologia proposta por Williams *et al.*(1990) fazendo-se algumas alterações, com as seguintes concentrações finais: DNA genômico (30ng/µl), tampão 10X Tris-HCl/KI (10mM/50mM), MgCl₂ (15mM), dNTPs (10mM), *primer* (100mM), Taq DNA polimerase (5 unidade) e água ultra pura para completar 10µl. As amplificações foram efetuadas em um termociclador Ampliterm – Thermal Cyclers sob as seguintes condições: um ciclo a 94°C por 5 minutos; 45 ciclos de 94°C/15 segundos, 38°C/1

minuto e 30 segundos e 72°C/1 minuto; ao final desses, um ciclo a 72°C por 7 minutos e logo após, reduziu-se a 4°C.

Os *primers* usados para a amplificação foram 15 oligonucleotídeos decâmeros de sequência arbitrária, do kit operon, possuindo as mesmas temperaturas de anelamento (tabela 2).

TABELA 2. Sequências dos *primers* utilizados nas reações de RAPD em pinhão manso.

Primer	Seqüência 5' – 3'	Ta (°C)
A-03	AGTCAGCCAC	39,5
A-04	AATCGGGCTG	39,5
A-05	AGGGGTCTTG	39,5
A-07	GAAACGGGTG	39,5
A-08	GTGACGTAGG	39,5
A-10	GTGATCGCAG	39,5
A-11	CAATCGCCGT	39,5
A-12	TCGGCGATAG	39,5
A-14	TCTGTGCTGG	39,5
A-15	TTCCGAACCC	39,5
A-16	AGCCAGCGAA	39,5
A-17	GACCGCTTGT	39,5
A-18	AGGTGACCGT	39,5
A-19	CAAACGTCCG	39,5
A-20	GTTGCGATCC	39,5

Os produtos resultantes das amplificações foram separados por eletroforese em gel de agarose a 0,8%, a 100V, em tampão TBE 1X (Tris-Boro-EDTA) por 1 hora e 20 minutos e para coloração foi adicionado em cada amostra 2µl de GelRed™. Os fragmentos amplificados foram visualizados em um transluminador UV LTB – 20X20ST e fotografados em sistema digital L-PIX – HE da Loccus do Brasil da Universidade Federal do Piauí, Campus de Parnaíba.

B. Análise RAPD

Para detectar-se quantas bandas cada primer amplificou independentemente, a partir da leitura dos géis, foi realizada uma matriz de dados envolvendo os dois acessos, atribuindo-se valor igual a 1, para banda presente e 0 para banda ausente, baseado no programa Estatístico Genes Darwin, usando uma planilha no Excel (tabela 3).

Tabela 3. Número de bandas amplificadas em cada primer RAPD nas amostras (P e U) analisadas.

PRIMERS	Numero de Bandas	
	P	U
A03	15	0
A-04	14	7
A-05	13	6
A-07	11	6
A-08	8	10
A-10	7	6
A-11	7	4
A-12	7	6
A-14	3	4
A-15	5	4
A-16	0	0
A-17	7	4
A-18	9	10
A-19	8	5
A-20	4	4

Resultados e Discussão

Dos 15 iniciadores RAPD utilizados na reação de PCR para as duas amostras (P e U) em estudo, apenas os primers A-16 (figura 02) e A-03 (figura 02) não amplificaram, podendo inferir que houve problemas na extração de DNA ou as sequências dos primers em questão não são específicas com as sequências das amostras analisadas. Pode-se observar que o primer A-16 na amostra U (figura 02) não amplificou bandas e o produto da PCR da amostra P (figura 01) não foi utilizado na eletroforese, pois o material foi perdido durante manuseio no laboratório. O primer A-03 amplificou somente na amostra P (figura 1).

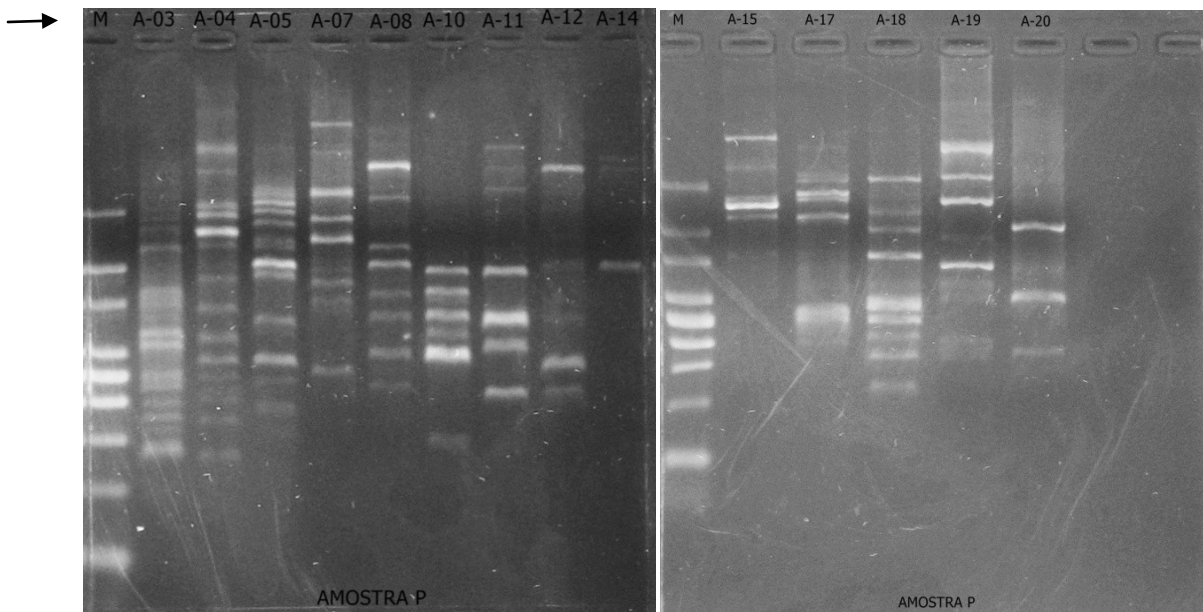


Figura 01. Padrões de bandeamento da Amostra P de pinhão manso obtidos, utilizando os primers A-03, A-04, A-05, A-07, A-08, A-10, A-11, A-12, A-14, A-15, A-17, A-18 e A-20. M – Marcador de peso molecular *Ladder* 100pb, indicado na seta à esquerda.

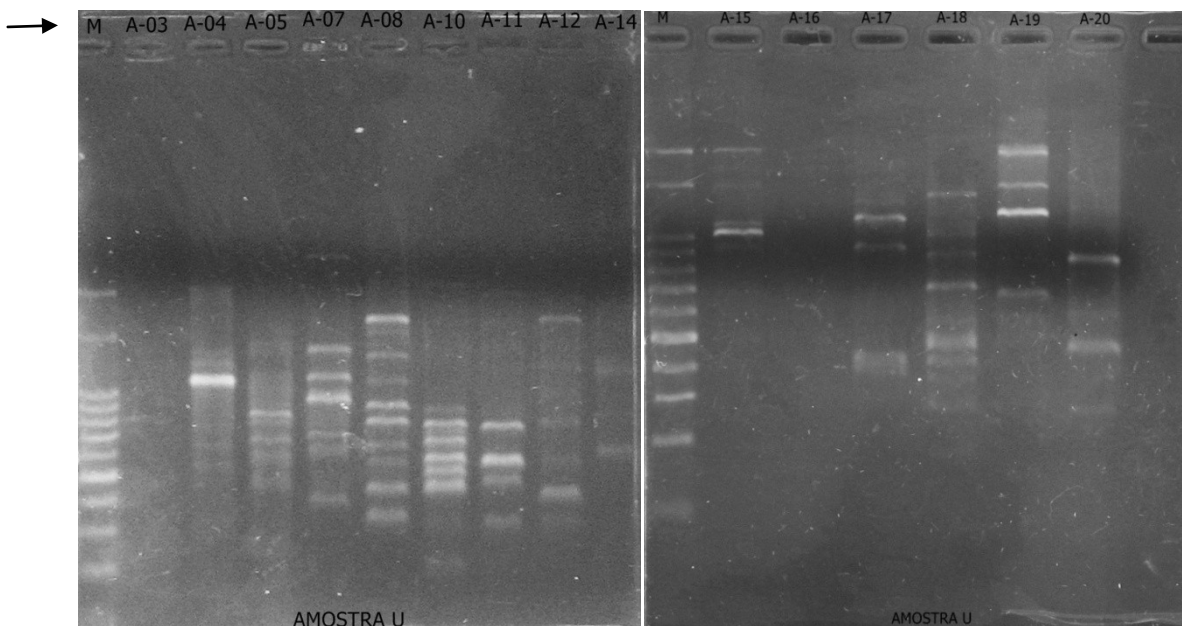


Figura 02. Padrões de bandeamento da Amostra U de pinhão manso obtidos, utilizando os primers A-03, A-04, A-05, A-07, A-08, A-10, A-11, A-12, A-14, A-15, A-17, A-18 e A-20. M – Marcador de peso molecular *Ladder* 100pb, indicado na seta à esquerda.

Conclusão

Diante dos resultados obtidos o primer A-03 (Amostra U) e A-16 (Amostra U), não amplificaram o que pode se dizer que esses primers não são específicos para o genoma dessa

amostra. Os marcadores RAPD detectaram bandas polimórficas principalmente na amostra P, com os primers (A-03, A-04, A-05, A-07). Esses iniciadores que mais detectaram polimorfismo serão indicados para ser utilizados no estudo de caracterização molecular com mais indivíduos para análise de divergência genética desta cultura.

Apoio: Universidade Federal do Piauí – Campus Parnaíba

Referências bibliográficas

ARRUDA, F.P.; BELTRÃO, N.E.M.; ANDRADE, A.P.; PEREIRA, W.E. & SEVERINO, L. S. Cultivo de Pinhão Manso (*Jatropha curcas* L.) como alternativa para o semi-árido nordestino. **Revista Brasileira de Oleoginosas e Fibrosas**. Campina Grande, v.8, n.1, p. 789-799, Jan/abr. 2004.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v. 19, p. 11-15, 1987.

GRATAPLAGLIA, D. Marcadores moleculares em espécies florestais: *Eucalyptus* como modelo. In: NASS, L. L. *et al* (Ed). **Recursos genéticos e melhoramento**: Plantas. Rondonópolis:Fundação MT, P. 967-1010, 2001.

PALMIERI, D.A. ; MAIA, L.C. . Marcadores microsatélites para estudos genéticos em mamona (*Ricinus communis* L.) e pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.). In: Congresso Internacional de Agroenergia e Biocombustíveis, 2, 2007, Teresina, PI. **Anais...** Teresina, 2007, p. 138.

SUJATHA, M.; REDDY, T.P.; MAHASI, M.J. Role of biotechnological interventions in the improvement of castor (*Ricinus communis* L.) and *Jatropha curcas* L. **Biotechnology Advances**, v.26, p.424-435, 2008.

WILLIAMS, J. K. G.; KUBELI, K. J.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**. v. 18, p. 6531-6535, 1990.

Palavras-chave: Biodiesel, RAPD, Polimorfismo.