**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Diversidade genética em germoplasma de pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.)
identificada por marcadores SSR e ISSR**

Stella Maris Nucci

**Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em
Ciências. Área de concentração: Genética e
Melhoramento de Plantas**

**Piracicaba
2011**

Stella Maris Nucci
Bacharel em Ciências Biológicas

**Diversidade genética em germoplasma de pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.)
identificada por marcadores SSR e ISSR**

Orientador:
Prof. Dr. JOSÉ BALDIN PINHEIRO

**Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em
Ciências. Área de concentração: Genética e
Melhoramento de Plantas**

Piracicaba
2011

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - ESALQ/USP**

Nucci, Stella Maris

Diversidade genética em germoplasma de pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.)
identificada por marcadores SSR e ISSR / Stella Maris Nucci. - - Piracicaba, 2011.
126 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2011.

1. Diversidade genética 2. Euphorbiaceae 3. Germoplasma vegetal 4. Marcador
molecular 5. Pinhão-manso 6. Plantas oleaginosas 7. Variação genética I. Título

CDD 633.85
N962d

“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor”

*Ao meu querido pai e amigo Osvaldo,
com muito amor e profunda gratidão,*

DEDICO

*À minha mãe Elsa (in memoriam),
querida e amada, com absoluta saudade,*

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

Ao pesquisador, amigo e orientador Prof. Dr. José Baldin Pinheiro, pela compreensão e amizade, pela confiança e ensinamentos, pela oportunidade, importantes no curso e na minha vida profissional;

À pesquisadora, amiga e eterna orientadora Dra. Maria Imaculada Zucchi, pela confiança e ensinamentos, pelo auxílio, amizade, atenção dispensada durante a realização deste trabalho;

À pesquisadora, colaboradora e amiga Dra. Regina Priolli por toda colaboração e incentivo;

Aos pesquisadores Glyn Mara Figueira e Marcos Nopper Alves por disponibilizar o germoplasma do CPQBA e a professora Renata Silva Mann por disponibilizar o germoplasma da UFS para este estudo;

À querida amiga Larissa Di Cassia Laperuta pela amizade, solidariedade nos momentos difíceis (que não foram poucos) e pelos almoços que já deixam saudades;

Agradeço todos os amigos que foram importantes e fizeram parte dessa fase de minha formação, Fátima Bosetti, Milene Möller, Michelle Fonseca, Carlos Eduardo Araújo Batista, Thiago Mezette, Camila Cunha, Carol, aos demais amigos da pós-graduação e do Laboratório de Diversidade Genética e Melhoramento, que foram muitos no decorrer do curso;

Aos amigos Miklos Maximiliano Bajay, Marisa Monteiro e Vitor Pavinato pela amizade e por todo o suporte e valiosa ajuda e a todos que colaboraram para a realização e finalização deste trabalho;

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas da PG-ESALQ, pela amizade, incentivo e pelos conselhos e ensinamentos constantes transmitidos;

Aos funcionários da PG-ESALQ, pelo auxílio e atenção no decorrer do curso;

Ao CAPES e CNPQ pela bolsa de doutorado, que permitiram a conclusão deste curso;

Agradeço aos membros da banca de qualificação pela leitura e pela contribuição crítica no aperfeiçoamento de idéias;

Ao meu pai, muito amado, a quem devo tudo que sou e tudo que tenho, por acreditar na minha capacidade, por me incentivar a concluir este trabalho, pelo carinho, amor e atenção;

À minha mãe, de quem tenho tanta saudade e por quem cultivo amor eterno, que compartilhou comigo muitos momentos alegres e difíceis, cuja dedicação foi fundamental para que eu chegasse até aqui, mas que infelizmente partiu no decorrer deste curso e não está mais aqui para dividir comigo mais este momento de alegria e realização. Mãezinha... Estamos e estaremos juntas para sempre, onde quer que você esteja... Onde quer que eu esteja;

À minha querida Cidoca, mãe de coração, pela amizade, carinho, preocupação, pelas orações, por estar ao meu lado no momento mais crítico e sofrido da minha vida;

À amiga e fisioterapeuta Thaís Campidelli, cuja amizade e cuidados foram de extrema importância para que eu chegasse até aqui;

À amiga Marina Lamounier pela amizade, carinho e pelos bate-papos;

Aos amigos Tânia Theobaldo e Adauto Ferreira pelo carinho, incentivo e amizade;

Às amigas recém chegadas, porém, não menos importantes, Maristela, Luciane, Vanderli e Simone, obrigada pela amizade e acolhimento tão carinhoso que trouxeram luz para minha vida;

À Deus por todas as bênçãos recebidas, por ter me carregado no colo nos momentos difíceis, por Sua infinita misericórdia, por estar sempre guiando minha vida e iluminando meu caminho, pelos anjos que o Senhor está sempre colocando no meu caminho, me fazendo seguir adiante sem esmorecer. Obrigada Pai, por sua infinita bondade!

*“Não desampare a sabedoria, e ela te guardará; ama-a e ela te protegerá.
O princípio da sabedoria é: adquira a sabedoria;
sim, com tudo o que possuis, adquira o entendimento.”*

(Provérbios 4:6-7)

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	13
LISTA DE FIGURAS.....	15
LISTA DE TABELAS.....	17
1 INTRODUÇÃO.....	19
2 DESENVOLVIMENTO.....	23
2.1 Pinhão-manso (<i>Jatropha curcas</i> L.).....	23
2.1.1 Aspectos taxonômicos e botânicos.....	23
2.1.2 Usos da espécie.....	29
2.1.3 Potencial para exploração econômica.....	30
2.2 Diversidade e Melhoramento Genético do Pinhão-manso.....	39
2.3 Análises Genética de Populações Naturais e Artificiais de Plantas.....	41
2.4 Marcadores Moleculares.....	42
2.4.1 Marcadores microssatélites.....	46
2.4.1.1 Análise da estrutura genética com marcadores codominantes.....	48
2.4.2 Marcadores <i>Inter Simple Sequence Repeats</i> (ISSR).....	52
2.4.2.1 Análise da estrutura genética utilizando marcadores dominantes.....	53
2.5 Material e Métodos.....	56
2.5.1 Material vegetal utilizado para a caracterização da estrutura genética populacional da espécie <i>Jatropha curcas</i>	56
2.5.2 Material vegetal utilizado para avaliar a diversidade genética entre acessos de pinhão-manso de bancos de germoplasma.....	57
2.5.3 Extração e quantificação de DNA.....	59
2.5.4 Desenvolvimento e Caracterização de Marcadores Microssatélites.....	60
2.5.4.1 Desenvolvimento de bibliotecas enriquecidas com locos microssatélites.....	60
2.5.4.2 Construção de biblioteca genômica enriquecida com microssatélites.....	60
2.5.4.3 Seleção e sequenciamento dos clones positivos.....	63
2.5.4.4 Avaliação do polimorfismo dos locos microssatélites.....	67
2.5.4.5 Condições de amplificação dos locos microssatélites.....	67
2.5.4.6 Metodologia de análise estatística dos dados co marcador codominante.....	68

2.5.5 Teste e seleção de <i>primers</i> ISSR	69
2.5.5.1 Metodologia de análise estatística dos dados com marcador dominante.....	69
2.5.6 Resultados.....	71
2.5.6.1 Caracterização da estrutura genética populacional da espécie <i>Jatropha curcas</i>	71
2.5.6.1.1 Desenvolvimento de bibliotecas enriquecidas com locos microssatélites.....	71
2.5.6.1.2 Análise das sequências, desenvolvimento e utilização dos <i>primers</i> microssatélites...	72
2.5.6.1.3 Avaliação do polimorfismo dos locos microssatélites.....	79
2.5.6.2 Diversidade genética entre acessos de pinhão-manso de bancos de germoplasma.....	80
2.5.6.2.1 Avaliação do polimorfismo dos locos microssatélites.....	80
2.5.6.2.2 Avaliação do polimorfismo dos locos ISSR.....	84
2.5.6.2.2.1 Teste e seleção de <i>primers</i> ISSR.....	84
2.5.6.2.2.2 Avaliação do polimorfismo e caracterização da estrutura genética com marcadores ISSR	85
2.5.7 Discussão.....	89
3 CONCLUSÕES.....	99
REFERÊNCIAS.....	101
ANEXOS.....	115

RESUMO

Diversidade genética em germoplasma de pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) identificada por marcadores SSR e ISSR

O pinhão-manso (*Jatropha curcas*) é uma espécie arbórea de ampla distribuição geográfica e com qualidades que a tornam importante do ponto de vista natural, ecológico e principalmente sócio-econômico, pois seus frutos são uma valiosa fonte de óleo vegetal com potencial para produção de biodiesel, proporcionando vantagens ambientais, econômicas e sociais. Este trabalho teve como objetivo avaliar a diversidade genética no germoplasma de pinhão-manso e para isto foram utilizados marcadores moleculares microssatélites e ISSR. A partir de uma biblioteca enriquecida com locos microssatélites foram desenvolvidos 18 pares de *primers* para a espécie, sendo estes utilizados, juntamente com 30 pares de *primers* SSR desenvolvidos no CBMEG, visando à caracterização e estudo da estrutura genética populacional. Os acessos dos bancos de germoplasma do CPQBA (Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas) da UNICAMP e da UFS (Universidade Federal de Sergipe) foram avaliados. O germoplasma pertencente ao CPQBA está organizado em 12 populações e o da UFS representado por 17 acessos únicos. Não foi observado polimorfismo entre as populações inviabilizando o estudo populacional. A caracterização dos grupos formados pelos acessos dos bancos de germoplasma foi realizada utilizando 14 marcadores ISSR, revelando que 86,64% da variação genética encontram-se dentro dos grupos e 13,36% entre eles. O número médio total de alelos (n_a) foi de 1,99 alelos por loco e o número efetivo de alelos (n_e) foi de 1,42 alelos por loco. A diversidade genética de Nei (1973) indicou uma baixa diversidade genética dentro dos grupos (0,26), assim como o Índice de Shannon (I) para os acessos (0,41), considerado um baixo valor de diversidade genética. A análise bayesiana alocou todos os acessos avaliados em quatro grupos, todos os acessos apresentaram $Q > 0,8$. Os grupos formados não apresentaram nenhuma relação com a origem dos acessos. O índice médio de similaridade de Jaccard indicou que existem 30% de similaridade entre os grupos e a amplitude de similaridade variou de 0,23 a 0,94. O dendrograma formou os mesmos quatro grupos de acessos que o formado pela análise bayesiana, tornando ainda mais consistente os resultados obtidos na presente análise. O estudo revela a necessidade e importância de reunir o maior número possível de acessos de diferentes regiões e países para formar o banco de germoplasma da espécie viabilizando a conservação e programas de melhoramento da espécie, haja vista seu promissor potencial para produção de bicomcombustível.

Palavras-chave: Euforbiácea; Oleaginosas; Marcadores moleculares; Variabilidade genética; Banco de germoplasma

ABSTRACT

Genetic diversity of physic nut (*Jatropha curcas* L.) germplasm investigated by SSR and ISSR

Physic nut (*Jatropha curcas*) is a geographically widespread perennial plant species. It is ecologically important in natural communities and economically due to the oil extracted from its fruits that exhibit high potential for biodiesel production, thus, providing environmental, economical and social advantages. The current work aimed to evaluate the genetic diversity in physic nut germplasm using microsatellites and ISSR molecular markers. From a microsatellite-enriched library, 18 primer pairs were developed for the species and were used along with 30 SSR primer pairs developed at CBMEG to characterize and study the population genetic structure. Accessions from the germplasm banks at CPQBA (Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas) from UNICAMP and from UFS (Universidade Federal de Sergipe) were evaluated. The germplasm from CPQBA is organized in 12 populations whereas the accessions from UFS represent 17 soloist accessions. The polymorphism observed between the populations does not impair population genetic studies. The clusters of accessions from the germplasm Banks were characterized using 14 ISSR markers, revealing 86.64% of the genetic diversity are found within the clusters whereas between them, it corresponds to 13.36%. The total average number of alleles per locus (n_a) corresponded to 1.99 and the effective number of alleles (n_e) was of 1.42 alleles per locus. The genetic diversity, investigated as in Nei (1973), indicated a low genetic diversity within the groups (0.26). Shannon index (I) for the accessions evidenced a low value of genetic diversity (0.41). Bayesian analyses of all investigated accessions in four groups demonstrated that all the accessions exhibit $Q > 0.8$. The clustering patterns did not indicated origin relationships among the accessions. Jaccard average index indicated 30% of similarity between the groups and the amplitude of similarity ranged from 0.23 to 0.94. The dendrogram analysis grouped the four clusters generated by the Bayesian analysis, confirming the consistency of the results. The current study reveals the necessity and importance of gathering as many germplasm accession as possible for the species in order to allow the establishment of conservation and breeding program strategies, considering the potential of the species for biofuel production.

Keywords: Euphorbiaceae; Oil plant; Molecular markers; Genetic variability; Germoplasm bank

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Distribuição geográfica da espécie <i>Jatropha curcas</i> L.....	24
Figura 2 – Cromossomos de <i>J. curcas</i>	25
Figura 3 – Pinhão-manso.....	26
Figura 4 – a. Folhas de pinhão-manso; b. inflorescência de pinhão-manso.....	27
Figura 5 – Frutos de pinhão-manso.....	28
Figura 6 – Sementes de pinhão-manso.....	28
Figura 7 – Esquema representativo das etapas de extração de DNA pelo método CTAB.....	60
Figura 8 – Esquema representativo das etapas da construção da biblioteca enriquecida com locos microssatélites.....	66
Figura 9 – Porcentagem de motivos microssatélites encontrados nos 89 insertos sequenciados que apresentaram pelo menos uma região microssatélite.....	72
Figura 10 – Frequência de motivos microssatélites perfeitos e compostos.....	74
Figura 11 – Motivos microssatélites perfeitos e as frequências de motivos dinucleotídeos e trinucleotídeos.....	75
Figura 12 – Frequência de motivos microssatélites perfeitos, compostos e compostos interrompidos.....	78
Figura 13 – Motivos microssatélites perfeitos e as frequências de motivos dinucleotídeos, trinucleotídeos e tetranucleotídeos.....	78
Figura 14 – Gel de poliacrilamida mostrando perfil monomórfico, entre e dentro das populações, de um dos <i>primers</i> microssatélites analisados (<i>primer</i> JC1-C2 ou JC-B5) e comparado com marcador molecular padrão de 10 pb DNA <i>Ladder</i>	80
Figura 15 – Gel de poliacrilamida mostrando perfil monomórfico do <i>primer</i> Pinhão SP6 G9-1, nos 29 acessos de pinhão-manso.....	83
Figura 16 – Gel de poliacrilamida mostrando perfil polimórfico do <i>primer</i> JC1 – E9, nos 29 acessos de pinhão-manso.....	83
Figura 17 – Gel de agarose mostrando perfil polimórfico de um dos <i>primers</i> ISSR utilizados (<i>primer</i> M2).....	85
Figura 18 – a. Número real de K escolhido a partir dos valores de ΔK (EVANO et al., 2005); b. valores de $\log \ln (K)$ e desvios para cada valor de K, calculado de acordo com o proposto por Pritchard et al. (2000).....	88
Figura 19 – Teste de atribuição para os acessos de <i>J. curcas</i> estudados ($K = 4$).....	89
Figura 20 – Dendrograma baseado na similaridade da Jaccard e agrupamento pelo critério UPGMA em acessos de pinhão-manso.....	90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Coeficientes técnicos de matérias-primas oleaginosas tradicionais.....	33
Tabela 2 –	Propriedades físico-químicas do óleo de pinhão-manso.....	35
Tabela 3 –	Especificação padrão dos óleos de pinhão-manso e diesel.....	36
Tabela 4 –	Propriedades do biodiesel produzido a partir do óleo vegetal de pinhão-manso....	37
Tabela 5 –	Esquema da análise de variância molecular (AMOVA).....	54
Tabela 6 –	Origens das populações analisadas neste estudo, estabelecidas no campo experimental do CPQBA.....	56
Tabela 7 –	Identificação dos acessos de pinhão-manso, estabelecidos no campo experimental da UFS.....	57
Tabela 8 –	Identificação dos acessos de pinhão-manso, originados dos bancos de germoplasma.....	58
Tabela 9 –	<i>Primers</i> desenhados a partir das seqüências microssatélites desenvolvidas neste estudo	73
Tabela 10 –	Locos SSR, desenvolvidos e testados neste estudo, todos monomórficos.....	75
Tabela 11 –	<i>Primers</i> desenhados a partir das sequências microssatélites desenvolvidas no CBMEG.....	76
Tabela 12 –	Locos SSR, desenvolvidos no CBMEG da Unicamp, monomórficos.....	79
Tabela 13 –	Locos microssatélites desenvolvidos neste trabalho e utilizados na caracterização dos acessos de pinhão-manso.....	81
Tabela 14 –	Locos microssatélites desenvolvidos no CBMEG e utilizados na caracterização dos acessos de pinhão-manso.....	81
Tabela 15 –	<i>Primers</i> selecionados, suas respectivas sequências, temperatura de reassociação e número de bandas produzidas.....	84
Tabela 16 –	Análise de variância molecular (AMOVA) para os dois grupos de acessos de <i>J. curcas</i>	86
Tabela 17 –	Análise da variância molecular (AMOVA) baseada no teste de atribuição (Structure), K = 4.....	86
Tabela 18 –	Estimativas da diversidade entre os dois grupos de <i>Jatropha curcas</i>	86
Tabela 19 –	Estimativas da diversidade total (29 acessos) de <i>Jatropha curcas</i>	87

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Jatropha* L. é constituído por 175 espécies tropicais e subtropicais, e a espécie *Jatropha curcas* L., foco deste estudo, é mais conhecida popularmente no Brasil por pinhão-manso. É uma espécie monóica, arbórea, perene, nativa da América Tropical que foi disseminada para todas as demais partes tropicais do mundo, entretanto, o verdadeiro centro de origem/diversidade da espécie ainda é considerado desconhecido. No Brasil ocorre em quase todas as regiões, adaptando-se a condições variáveis de clima e solo, mas ainda encontra-se em processo de domesticação. De particular importância, o fruto do pinhão-manso, tem despertado grande interesse sócio-econômico por sua capacidade de produção de óleo vegetal, de suas sementes se extraem um óleo viscoso que pode ser usado para fazer sabão, na indústria de cosméticos, como substituto ao diesel ou querosene e, ainda, queima sem emitir fumaça ou odores. Outras características que tornam esta euforbiácea atraente para o agronegócio são tolerância ao déficit hídrico, não ser apreciada como alimento por vertebrados herbívoros, ser menos exigente em nutrientes, apresentar capacidade de recuperação de áreas degradadas em função de suas raízes profundas e crescer em solos de baixa fertilidade (TEIXEIRA, 2005). Esta oleaginosa leva de três a quatro anos para atingir a idade produtiva, que se estende por pelo menos 40 anos, e produz, no mínimo, duas toneladas de óleo por hectare (CARNIELLI, 2003).

O cenário mundial mostra a necessidade iminente de substituir o uso de fontes fósseis, como o petróleo e o carvão mineral, como matéria energética, que geram emissões de poluentes locais, gases de efeito estufa e põem em risco o suprimento de longo prazo no planeta, para o uso de fontes renováveis e biodegradáveis na produção de energia. Neste contexto, o Brasil, devido sua dimensão continental, sua heterogeneidade de clima e solo, diversidade de oleaginosas disponíveis, desponta no mundo como um importante centro de produção de matéria-prima para o mercado de energias renováveis. Estima-se que se encontram aqui mais de 200 espécies de oleaginosas com potencial para produzir óleo vegetal que pode ser usado como fonte de matéria-prima para a produção de energia.

O interesse pelo pinhão-manso surgiu por volta do ano de 2003, com a retomada do desenvolvimento tecnológico incentivado pelo Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel (PNPB), e desde então vários pesquisadores destacam o pinhão-manso como uma planta com grande potencial como matéria-prima na produção de biodiesel. Diversos autores destacam várias qualidades e vantagens da espécie, entre as mais citadas estão o alto teor de óleo

encontrado em suas sementes, que se alia a características físico-químicas do óleo, rusticidade da planta, resistência à seca e ao ataque de pragas, ser adaptável a uma vasta gama de ambientes e condições edafoclimáticas e a vantagem de ser perene. Atualmente, o pinhão-mansó já está sendo explorado com bastante êxito na Índia, no Continente Africano e na América Central. No Brasil, entretanto, a falta de conhecimento científico sobre essa cultura dificulta sua divulgação, fazendo-se necessário, estudos por parte de instituições de pesquisa que possibilitem fazer recomendações técnicas seguras sobre seu cultivo, colheita e aproveitamento industrial.

Visando o melhoramento genético e desenvolvimento de genótipos superiores de pinhão-mansó, acessos de *J. curcas* L. têm sido introduzidos para ampliação do banco ativo de germoplasma da espécie. Para o sucesso de um programa de melhoramento genético desta euforbiácea é necessário a obtenção da máxima variabilidade genética disponível e avaliação de acessos divergentes com características desejáveis. Por isso, é muito importante o levantamento de informações quanto à diversidade do germoplasma disponível para o estabelecimento de coleções com variação genética representativa do gênero *Jatropha*. O germoplasma disponível no mundo necessita de informações quanto à base genética, apresenta produção variável, alta vulnerabilidade a insetos e doenças e baixa diversidade genética. Poucas variedades têm sido selecionadas em diferentes países: a variedade Cabo Verde, que segundo alguns autores, foi distribuída por todo o mundo; a variedade Nicarágua, com poucos porém grandes frutos e a variedade mexicana não tóxica desprovida de ésteres de forbol, cujo óleo pode ser usado para consumo humano e a torta, rica em proteínas, para a ração animal (MARQUES e FERRARI, 2008). Para usar a variabilidade genética pré-existente é preciso estudos da extensão desta variabilidade no germoplasma disponível, para isto são utilizadas ferramentas moleculares, ao mesmo tempo em que são feitos estudos para caracterização fitoquímica do óleo e da torta.

O estudo da diversidade genética é o processo pelo qual a variação genética entre populações, entre grupos ou entre indivíduos de um grupo é analisada por meio de um método específico ou de uma combinação de métodos, aqui neste trabalho os marcadores moleculares SSR (*simple sequence repeats*) e ISSR (*inter simple sequence repeats*) foram utilizados como ferramentas neste estudo.

Este estudo teve como objetivos principais o desenvolvimento de bibliotecas enriquecidas com marcadores moleculares microssatélites e caracterização de locos SSR em *J. curcas*. Os

marcadores SSR desenvolvidos e os ISSR foram utilizados para avaliar a diversidade genética no germoplasma da espécie.

Os objetivos específicos deste estudo foram: a) isolar e seqüenciar locos que contenham regiões microssatélites no genoma de pinhão-manso; b) desenhar *primers* específicos visando à amplificação dos locos de microssatélites isolados e selecionados; c) caracterizar os locos de microssatélite identificados utilizando marcadores moleculares.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.)

2.1.1 Aspectos taxonômicos e botânicos

A família Euphorbiaceae, apresenta aproximadamente 317 gêneros e 8.000 espécies, que se distribuem principalmente nos trópicos e subtropicais (CRONQUIST, 1981). Esta é a segunda família mais representativa da Caatinga em número de espécies, superada apenas por Leguminosae (SAMPAIO, 1995). É dentro desta família que a espécie *Jatropha curcas* (Linnaeus) está classificada, sendo o gênero *Jatropha* L. constituído por 175 espécies tropicais e subtropicais (WEBSTER, 1994). Em termos taxonômicos está classificada em: divisão Magnoliophyta, classe Magnoliopsida, subclasse Dilleneadae, superordem Euphorbianaes, ordem Euphorbiales, família Euphorbiaceae, subfamília Crotonoideae, tribo Jatrophaeae, gênero *Jatropha* L. e espécie *Jatropha curcas* (L.) (THE TAXONOMICON, 2008). No Brasil, também é conhecido por: pinhão-da-índia, pinhão-de-purga, pinhão-de-cerca, pinhão-dos-barbados, pinhão-branco, pinhão-paraguaio, pinhão-bravo, purgante-de-cavalo, figo-do-inferno, mandobi-guaçu, medicineira, pinhão-croá, purgueira ou, simplesmente, purga. Trata-se de uma espécie da mesma família da mandioca, seringueira e mamona, nativa da América Tropical, possivelmente da América do Sul, Brasil e Antilhas, e que foi levada pelos navegadores portugueses para as ilhas de Cabo Verde e Guiné, no final do século XVIII, disseminada pelo continente africano e indiano, e mais tarde para todas as demais partes tropicais do mundo (PEIXOTO, 1973). Sem justificativas, Martin e Mayeux (1984) citam o estado de Ceará como centro de origem da espécie, entretanto, o verdadeiro centro de origem/diversidade da espécie ainda é considerado desconhecido. Wen et al. (2010) sugerem que provavelmente a domesticação da espécie ocorreu em parte na América e em parte em Hainan (China). Atualmente, a planta encontra-se distribuída em regiões tropicais de todo o globo (Figura 1), inclusive no Brasil, ocorrendo em quase todas as regiões do país, sempre de forma dispersa, adaptando-se a condições variáveis de clima e solo, sobretudo nos Estados do Nordeste, Goiás e Minas Gerais (CÁCERES et al., 2007; HEIFFIG e CÂMARA, 2008; ORGADEM, 2008). Apesar de já ser conhecida e cultivada quase sempre como cerca - viva, a espécie ainda encontra-se em processo de domesticação (SATURNINO et al., 2005a).

Duas variedades de pinhão-mansô foram diferenciadas pelos portugueses, conforme Cortesão (1957): a variedade catártica medicinal, a mais dispersa no mundo, com amêndoas muito amargas e purgativas; e a variedade árvore de coral, medicinal-de-espanha, árvore de nozes purgativas, com folhas eriçadas de pêlos glandulares que segregam látex, límpido, amargo, viscoso e cáustico.

Figura 1 – Distribuição geográfica da espécie *Jatropha curcas* L. (Fonte: ZIPCODEZOO, 2008)

Sadakorn (1984 *apudi* SATURNINO et al., 2005a), relata que o número de cromossomos do pinhão-mansô é $2n = 18$. Também foram realizados estudos com a espécie *Jatropha curcas* (L.) que apresentam indivíduos tetraplóides $2n = 44$. Em sua normalidade as espécies de *J. curcas* apresentam indivíduos $2n = 22$, como mostra estudos citogenéticos realizados por Carvalho et al. (2008), no qual os autores citam que o genoma de *Jatropha curcas* (L.) é relativamente pequeno, muito semelhante ao tamanho do genoma do arroz, que seu cariótipo é constituído por 22 cromossomos pequenos, sendo cinco pares metacêntricos e seis submetacêntricos (Figura 2), e que a possibilidade de um evento de poliploidização na história evolutiva de *J. curcas* é discutível.

O pinhão-mansô é uma planta arbórea que pode apresentar de três a cinco metros de altura, perene, semidecídua, monóica, tronco ou fuste com 20 a 30 cm de diâmetro que produz um abundante suco lácteo (Figura 3). Em solos pedregosos e de baixa umidade cresce rapidamente.

Figura 2 – Cromossomos de *J. curcas*: a. cromossomos metafásicos; b. cariógrama mostrando cinco pares de cromossomos metacêntricos (1,2,5,6 e 11) e seis submetacêntricos (3,4,7,8,9 e 10) (Fonte: CARVALHO et al., 2008)

O caule é liso de lenho mole, medula desenvolvida e pouco resistente, floema com longos canais que se estendem até as raízes, nos quais circula o látex, suco leitoso que ocorre com abundância mesmo em ferimentos pequenos. O tronco é dividido desde a base, em compridos ramos, com numerosas cicatrizes produzidas pela queda das folhas na estação seca, que ressurgem logo após as primeiras chuvas, a perda de folhas minimiza os estresses ambientais, como períodos prolongados de seca ou de frio. Suas folhas (Figura 4) quando novas apresentam coloração vermelho-vinho, cobertas com lanugem branca, e à medida que envelhecem se tornam verdes, esparsas e brilhantes, largas e alternadas, em forma de palma com três a cinco lóbulos e pecioladas, com nervuras esbranquiçadas e salientes na face inferior. O pecíolo é longo e esverdeado, do qual partem as nervuras divergentes. Os pecíolos caem, em parte ou totalmente, no final da época seca, ou durante a estação fria. A planta permanece em repouso até o início da primavera, ou início da estação chuvosa.

Suas flores são pequenas, amarelo-esverdeadas, pentâmeras, unissexuais em panículas terminais ou axilares. As flores femininas apresentam um pedúnculo longo, não articulado, com três células elípticas, ovário com três carpelos, cada um com um lóculo que produz um óvulo com três estigmas bifurcados separados, isoladas em menor número que as masculinas, as quais se localizam nas ramificações. As flores masculinas com dez estames, cinco unidos à coluna, são mais numerosas e situadas nas pontas das ramificações. Apresenta floração longa, sendo a polinização entomófila, realizada por abelhas, formigas, moscas, tripses, entre outros insetos. O florescimento do pinhão-mansinho tende a responder ao período de chuva, assim como o crescimento e a reprodução é influenciada pelo estágio nutricional da planta. Se ocorrer déficit nutricional, haverá menor crescimento e menor ramificação, afetando a produção de frutos, já que

os mesmos são produzidos nas pontas dos ramos. Cada inflorescência (Figura 4), em forma de cacho, pode dar origem a 10 ou mais frutos. O florescimento é um dos principais estágios fenológicos para a produção de óleo de *Jatropha curcas*, uma vez que o número de flores femininas e sua fecundação determinam quantos frutos e sementes serão desenvolvidas (JUHÁSZ et al., 2009). Estudos realizados na Índia observaram que em uma inflorescência a proporção é de 1-5 flores femininas para 25-93 flores masculinas, ou seja, uma razão média de 29 flores masculinas para cada flor feminina (SOLOMON RAJU e EZRADANA, 2002).

Figura 3 – Pinhão-mansô; a. planta de pinhão-mansô; b. plantio de pinhão-mansô no campo experimental do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) da Unicamp

O estudo do comportamento dos eventos biológicos vegetativos e reprodutivos das plantas, como brotamento, abscisão foliar, formação de botões, flores, frutos e suas relações com mudanças no ambiente biótico e abiótico, é denominado de fenologia (FERRAZ et al., 1999). Portanto, conhecer a fenologia de uma planta possibilita prever a época de reprodução, deciduidade, ciclos de crescimento vegetativo e sua relação com os fatores climáticos, os quais são fundamentais para a execução de diversas operações agrícolas como poda e colheita dos frutos (ARAÚJO e RIBEIRO, 2008). O pinhão-mansô é uma espécie monóica com protandria, seu sistema reprodutivo facilita a xenogamia e a geitonogamia. Em testes de polinização manual foram obtidos 96% de pegamento de frutos por xenogamia e 77% por geitonogamia. Os frutos xenogâmicos, quando iniciados, desenvolveram-se até a maturação, enquanto que nos frutos geitonogâmicos foi observada uma taxa de 23% de abortamento. A capacidade de autopolinização através da geitonogamia é considerada uma adaptação da espécie para sua colonização (SOLOMON RAJU e EZRADANA, 2002). Em estudos realizados por Paiva Neto et

al. (2010) foi verificado que ocorre fecundação nos processos de geitonogamia e xenogamia em *Jatropha curcas* L., não havendo autoincompatibilidade na reprodução sexuada, sendo os índices de fecundação bastante elevados e indiferentes estatisticamente em todos os tratamentos, com valores acima de 80%, exceto para o controle negativo em que as inflorescências foram isoladas e não polinizadas, resultando em ausência de fecundação e de frutos, mostrando a importância da visitação de insetos para a obtenção de sucesso no processo reprodutivo da espécie. As flores masculinas, doadoras de pólen, abrem no período da manhã, assim como as femininas. Sendo assim, embora havendo visitação de insetos durante todo o dia, o processo de polinização ocorre no período matutino, em razão da quase total ausência de pólen no período vespertino.

Figura 4 – a. Folhas de pinhão-mansão; b. inflorescência de pinhão-mansão

O fruto é capsular com 2,5 a quatro cm de comprimento, por dois a 2,5 cm de diâmetro, de cor marrom-escuro, quando seco, quase roliço e entre os carpides ligeiramente sulcado, com base e ápice agudos, endocarpo rijo e duro, mesocarpo carnoso e filiforme e epicarpo carnoso, semeado de pequenas elevações puntiformes (Figura 5). Cada fruto é uma cápsula trilocular que contém três sementes escuras, lisas, dentro das quais se encontra a amêndoa branca, tenra e rica em óleo. Estas sementes, indeiscentes, apresentam em média dois cm de comprimento, por 11 mm de largura, e nove mm de espessura, sendo oblongas eliptóides, pálidas, bastante estriada de linhas e salientes, reticuladas (Figura 6). A semente contém 66% de cascas, fornece de 50 a 52% de óleo extraído com solventes e 32 a 35% em caso de extração por expressão (trituração e aquecimento da amêndoa) (CORTESÃO, 1957; PINHÃOMANSO, 2006; CÁCERES et al., 2007; LUO et al., 2007; SANTOS et al., 2007; ARAÚJO e RIBEIRO, 2008; ORGADEM, 2008).

Figura 5 – Frutos de pinhão-mansão: a. frutos verdes; b. frutos amadurecendo

Figura 6 – Sementes de pinhão-mansão: a. sementes; b. lóculos do fruto com e sem sementes (Fonte: MYBELOJARDIM, 2010)

O pinhão-mansão além de produzir óleo vegetal, é tolerante ao déficit hídrico, não é apreciado como alimento por vertebrados herbívoros, é menos exigente em nutrientes, apresenta capacidade de recuperação de áreas degradadas em função de suas raízes profundas, crescendo em solos de baixa fertilidade (TEIXEIRA, 2005). Saturnino et al. (2005b) realizaram um estudo para verificar o comportamento do pinhão-mansão em solos marginais e de baixa fertilidade, para isto foram coletadas amostras de solos, sob a copa da planta, em diversas localidades de Minas Gerais, as quais foram analisadas no Laboratório de Solos da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG-CTNM). Os resultados confirmaram o alto grau de adaptabilidade desta planta a condições adversas. A planta pode se desenvolver em vários tipos de solo, inclusive naqueles arenosos, pedregosos, salinos, alcalinos e rochosos, os quais, sob o ponto de vista nutricional e físico, são restritivos ao pleno desenvolvimento de raízes, é uma planta que

responde a doses de potássio e fósforo, promovendo um crescimento inicial rápido. A espécie se propaga tanto por via vegetativa ou clonal (estaquia, micropropagação, cultura de tecidos ou enxertia) como também por via seminal. A estaquia tem sido a forma mais comum de propagação vegetativa, isto se deve à facilidade de enraizamento e à abundância de ramos na planta (SATURNINO et al., 2005a; SANTOS et al., 2007).

O pinhão-mansô vem sendo plantado visando o controle de erosão, a recuperação de áreas degradadas, a contenção de encostas e de dunas, e ao longo de canais, rodovias, ferrovias, e como cerca-viva em divisões internas ou nos limites de propriedades rurais. No entanto, é responsivo à fertilidade do solo, com elevados aumentos na produtividade de sementes, além de alcançar produtividades acima de 5 t ha^{-1} (TEIXEIRA, 2005), pode ser cultivado em sistema de plantação convencional, em quadras, solteiro ou consorciado e em renques de contenção de encostas (SATURNINO et al., 2005a). Esta oleaginosa leva de três a quatro anos para atingir a idade produtiva, que se estende por pelo menos 40 anos, e produz, no mínimo, duas toneladas de óleo por hectare (CARNIELLI, 2003).

A ocorrência de pragas varia de acordo com a idade da planta, seu estágio nutricional, época do ano, proximidade de plantas hospedeiras e condições climáticas (SATURNINO et al., 2005a). O pinhão-mansô é pouco perseguido por insetos e doenças, mas existe a necessidade de combate preventivo à cigarrinha, formiga saúva, rapa-rapa, cupins e doenças consideradas leves. Entre as pragas nocivas ao desenvolvimento do pinhão-mansô, que não são muitas, consequência da presença de látex cáustico nas diversas partes da planta, incluem a *Corynorhynchus radula* – ataca folhas e flores; *Stiphra robusta* Leitão – ataca flores; *Retithrips syriacus* Mayet – ataca folhas; *Pachycoris torridus* Scopoli, *Sternocalaspis quatuordecim* Costata – ataca folhagens e *Coelos ternus notoriaceps* Marshall – ataca a haste (EPAMIG, 2008).

2.1.2 Usos da espécie

O pinhão-mansô não apresenta importância definida na cadeia alimentar. As primeiras aplicações comerciais utilizando esta espécie foram relatadas em Lisboa, onde o óleo importado de Cabo Verde (onde o pinhão-mansô assume importância econômica) foi usado na produção de sabão e em lamparinas para iluminação. A torta, resíduo da extração do óleo, foi utilizada como fertilizante para batatas (GÜBITZ et al., 1999). Várias partes apresentam valor medicinal, sua

casca contém tanino e rende uma tinta azul escuro, suas folhas têm sido usadas como substrato na criação de bicho da seda, contém uma substância antiinflamatória para uso medicinal, suas flores atraem abelhas e assim a planta tem potencial para produção de mel, sua madeira e seus frutos podem ser usados para finalidades diversas incluindo a produção de óleo vegetal para ser utilizado como combustível. O látex tem propriedades medicinais, pesticidas e no controle de moluscos. As sementes foram usadas como inseticida, forrageiras (variedades não-tóxicas ou quando detoxificadas), o óleo da semente para a produção do sabão, combustível, lubrificante, inseticida, uso medicinal e quando misturados com o óxido do ferro, podem ser usados no verniz. A torta da semente é útil como fertilizante ou na produção de biogás. Os briquetes podem ser usados como combustível, nutracêuticos, ou, após processamento adicional, como forrageiras (variedades não-tóxicas ou quando detoxificadas), e as cascas das sementes são combustíveis. As raízes contêm um óleo amarelo com fortes propriedades anti-helmínticas. De particular importância, o fruto do pinhão-manso, de cujas sementes se extraem um óleo viscoso que pode ser usado para fazer sabão, na indústria de cosméticos, como substituto ao diesel ou querosene e, ainda, queima sem emitir fumaça ou odores (OPENSHAW, 2000; SATURNINO et al., 2005; SIRISOMBOON et al., 2007). Atualmente, o cultivo de *Jatropha curcas* L. tem sido realizado visando principalmente à extração de óleo para a produção de biodiesel.

2.1.3 Potencial para exploração econômica

Atualmente, a sociedade brasileira e mundial preocupa-se com a transição do uso de fontes fósseis, como o petróleo e o carvão mineral, como matéria energética, que geram emissões de poluentes locais, gases de efeito estufa e põem em risco o suprimento de longo prazo no planeta, para o uso de fontes renováveis e biodegradáveis na produção de energia. Neste cenário, o Brasil, devido sua dimensão continental, sua heterogeneidade de clima e solo, diversidade de oleaginosas disponíveis, desponta no mundo como um importante centro de produção de matéria-prima para o mercado de energias renováveis. Estima-se que se encontram aqui mais de 200 espécies de oleaginosas com potencial para produzir óleo vegetal que pode ser usado como fonte de matéria-prima para a produção de energia, uma grande vantagem e ao mesmo tempo uma dificuldade, pois para cada agronegócio temos que ter toda a cadeia de produção funcionando em sincronia. Outra característica particular do Brasil é o desenvolvimento industrial em grande

escala e a aplicação das tecnologias de energia de biomassa. Bons exemplos disso são: a produção do etanol a partir da cana-de-açúcar, o carvão vegetal oriundo de plantações de eucaliptos, a co-geração de eletricidade do bagaço de cana e o uso da biomassa em indústrias de papel e celulose (cascas e resíduos de árvores, serragem, licor negro etc.). A utilização de biomassa no Brasil é resultado de uma combinação de fatores, incluindo a disponibilidade de recursos e mão-de-obra baratos, rápida industrialização e urbanização e a experiência histórica com aplicações industriais dessa fonte de energia em grande escala (BELTRÃO, 2006; GOLDEMBERG e LUCON, 2007).

A busca por fontes renováveis de energia está aumentando favoravelmente em todo o mundo, principalmente visando o uso de biodiesel. Atualmente, os maiores produtores mundiais de bioetanol são o Brasil e os EUA, a China está implementando um programa a fim de usar biocombustíveis. No caso específico do biodiesel, o Brasil é um exportador em potencial devido às limitações do aumento de produção na Europa, o que abre uma oportunidade sem precedentes para o Brasil de conquistar uma fatia do mercado Europeu (CARNEIRO et al., 2006). Este mercado é visto como um dos mais promissores para o biodiesel brasileiro por ser o continente onde o uso deste biocombustível está mais consolidado. Além da limitação de espaço para produção do biodiesel, a legislação da União Européia estabeleceu a substituição de 5,75% dos combustíveis fósseis por fontes renováveis de energia a partir de 2010 (SEBRAE AGRONEGÓCIOS, 2007). Outra lei, aprovada em 2008, exige, nos países europeus, um mínimo de 10% de fontes renováveis nos combustíveis para o transporte ferroviário e rodoviário até 2020 (MORGAM, 2010).

Essa capacidade de empregar óleos vegetais como óleo combustível em substituição ao óleo diesel despertou o interesse do governo brasileiro que criou, através do Ministério de Ciência e Tecnologia – MCT, o Programa Brasileiro de Biodiesel – PROBIODIESEL, regulamentado em 30 de outubro de 2002 pela Portaria MCT nº 702. Equivalente ao Pró-álcool, este programa visa o desenvolvimento integrado, em rede, das tecnologias de produção, industrialização e uso do biodiesel e de misturas com diesel, a partir de óleos vegetais puros e residuais, produzidos regionalmente (CARNEIRO, 2003).

Conforme a Lei nº 11.097, de 13 de janeiro de 2005, ficou estabelecida a obrigatoriedade da adição de um percentual mínimo de biodiesel ao óleo diesel comercializado ao consumidor, em qualquer parte do território nacional. Esse percentual obrigatório seria de 5% oito anos após a

publicação da referida lei, havendo um percentual obrigatório intermediário de 2% três anos após a publicação da mesma (BRASIL, 2005). Sendo assim, a partir de janeiro de 2008 passou a ser obrigatória a adição 2% de biodiesel no diesel utilizado pela frota brasileira, em julho de 2009 este percentual passou a ser de 4 %, e desde janeiro de 2010 houve a antecipação da meta de adição obrigatória de 5% de biodiesel no diesel usado para abastecimento de veículos, inicialmente, a previsão era tornar esse percentual obrigatório a partir de 2013 (RIBEIRO, 2009).

O biodiesel é um combustível derivado de fontes renováveis e biodegradável, obtido de várias formas tais como craqueamento, esterificação ou transesterificação que é o processo mais utilizado atualmente. Consiste na produção do biodiesel por meio da reação química de óleos vegetais ou óleo animal com um álcool (metanol ou etanol), sempre na presença de uma substância química chamada catalisador, que é fundamental para promover a transformação química, da qual também se extrai a glicerina, produto com aplicações diversas na indústria química. Além da glicerina, a cadeia produtiva do biodiesel gera uma série de outros subprodutos, como torta e farelo, que podem agregar valor e se constituir em outras fontes de renda importantes para os produtores. Este processo utiliza como matéria-prima, principalmente, óleos de várias espécies de plantas oleaginosas (BIODIESEL, 2008)

Em geral, os óleos vegetais apresentam viscosidade muito superior ao óleo diesel (Gráfico 1), motivo da necessidade de transformá-los em biodiesel através da reação de transesterificação (TEIXEIRA, 2005). O Brasil apresenta reais condições para se tornar um dos maiores produtores de biodiesel do mundo, conforme Miragaya (2005), por dispor de solo e clima adequados ao cultivo de oleaginosas, e cita que parte dessa área não é favorável ao plantio de gêneros alimentícios.

Atualmente, as matérias-primas para a produção de biodiesel provêm de fontes tradicionais como a soja, mamona, girassol, algodão e dendê, que possuem domínio tecnológico (zoneamento agrícola, sistema de produção, materiais certificados e infra-estrutura de produção de sementes).

Gráfico 1 – Comparação entre viscosidade de diversos óleos vegetais e diesel (Fonte: TEIXEIRA, 2005)

Entretanto, a produção de biodiesel no Brasil está sendo feita quase toda a partir da soja, que contribui com mais de 80% da produção, por ser a única oleaginosa que atende completamente aos quatro critérios estabelecidos para a inserção da matéria-prima na cadeia produtiva: (1) tecnologia agrônômica definida; (2) tecnologia industrial estabelecida; (3) logística e infra-estrutura para produção e (4) escala de produção para garantia de suprimento. As demais fontes contribuem com pequena participação, por razões diversas, entre elas, logística e escala de produção. Esta situação acarreta aumento no preço do grão de soja, gerando como problema um aumento no preço da matéria-prima que se torna maior do que o valor obtido na venda do produto final, o biodiesel. Mesmo atendendo aos requisitos agrônômicos para participação na cadeia produtiva, as oleaginosas tradicionais (Tabela 1) apresentam rendimento de óleo abaixo de 1.000 litros por hectare, o que é pouco viável e insustentável para um programa nacional com preços competitivos (EMBRAPA AGROENRGIA, 2008a; EMBRAPA AGROENERGIA, 2008b; GLOBO RURAL, 2008).

Tabela 1 – Coeficientes técnicos de matérias-primas oleaginosas tradicionais

Atributos das matérias-primas	Soja	Girassol	Amendoim	Mamona	Algodão
Produtividade agrícola média (kg.ha ⁻¹)	3.000	1.500	2.200	1.500	2.100
Conteúdo de óleo na semente (%)	18	42	45	47	15
Rendimento de óleo (kg.ha ⁻¹)	540	630	990	705	315
Produção brasileira em 2007 (m ³ .ano ⁻¹)	58 x 10 ⁶	161 x 10 ³	237 x 10 ³	155 x 10 ³	2,5 x 10 ⁶

(Fonte: EMBRAPA AGROENERGIA, 2008a)

A produção e o uso do biodiesel têm sido bastante incentivados pelo Governo Federal através do Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel (PNPB), bem como pelos governos de diversos Estados e municípios. O PNPB é um programa interministerial do Governo Federal que objetiva a implementação de forma sustentável, tanto técnica, como economicamente, a produção e uso do biodiesel, com enfoque na inclusão social e no desenvolvimento regional, via geração de emprego e renda. A forma de implantação do PNPB foi estabelecida por meio de um decreto de 23 de dezembro de 2003, e as principais diretrizes deste programa são: (1) implantar um programa sustentável, promovendo inclusão social; (2) garantir preços competitivos, qualidade e suprimento e (3) produzir o biodiesel a partir de diferentes fontes oleaginosas e em regiões diversas (BRASIL, 2010).

O interesse pelo pinhão-mansão surgiu por volta do ano de 2003 (BELTRÃO, 2006), com a retomada do desenvolvimento tecnológico incentivado pelo PNPB, e desde então vários pesquisadores destacam o pinhão-mansão como uma planta com grande potencial como matéria-prima na produção de biodiesel. As primeiras pesquisas com a espécie, aqui no Brasil, foram realizadas pela Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (Epamig), em parceria com a Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), no início da década de 1980. Entretanto, os plantios experimentais foram interrompidos e a pesquisa não avançou e nem gerou resultados concretos, por falta de recursos. Ainda assim, foi gerada uma boa quantidade de informações (DUARTE, 2008). Arruda et al. (2004), citam a espécie como promissora por seu elevado teor de óleo, 25 a 40%, superior ao da maioria das oleaginosas utilizadas no mercado de biocombustíveis. Tapanes et al. (2007), destacam que o pinhão-mansão é de fácil cultivo, e seu óleo tem variações pouco significativas de acidez, além de possuir melhor estabilidade à oxidação do que a soja e a palma, e boa viscosidade se comparada à mamona. Diversos autores destacam várias qualidades e vantagens da espécie, entre as mais citadas estão o alto teor de óleo encontrado em suas sementes, até 39,8% (SHAO-CHUN et al., 2007), que se alia a características físico-químicas do óleo (Tabela 2), rusticidade da planta, resistência à seca e ao ataque de pragas, ser adaptável a uma vasta gama de ambientes e condições edafoclimáticas e a vantagem de ser perene (TEIXEIRA, 1987; GÜBITZ et al, 1999; OPENSHAW, 2000; BELTRÃO, 2006; ZHOU et al., 2006; SIRISOMBOON et al., 2007; RANADE et al., 2008). Heiffig e Câmara (2008) mencionam que a utilização do pinhão-mansão como matéria-prima para a produção de biodiesel vem sendo amplamente discutida, pela possibilidade de sua implantação no Nordeste brasileiro e em outras

áreas com características edafoclimáticas desfavoráveis para outros cultivos. Outro aspecto favorável citado é a preservação das sementes durante longos períodos, resultando em menores custos de produção agrícola, quando comparado aos de culturas de oleaginosas como dendê ou macaúba, cujos frutos são rapidamente deterioráveis, motivo porque se exige seu processamento no máximo 48 horas após a colheita. A cultura se demonstra viável e promissora no PNPB por seu risco de investimento baixo, retorno rápido e período de vida útil da planta.

Já durante a 2ª Guerra Mundial o óleo das sementes de pinhão-mansão foi usado como combustível em motores, na África e na Ásia (SATURNINO et al., 2005a).

Tabela 2 – Propriedades físico-químicas do óleo de pinhão-mansão

Componentes	Fonte	
	Cetec (1983)	Reyadh (1999)
Viscosidade (31°C) cp	-	40,4
Índice de acidez	2,0	38,2
Índice de saponificação	189	195
Índice de iodo (Wijs)	97	101,7
Índice de peróxido	10	-
Número de hidroxila	76,6	-
Insaponificáveis (%)	1,1	-
Peso molecular médio	866	-
Ácido palmítico (%)	14,3	4,2
Ácido palmitoléico (%)	1,3	-
Ácido esteárico (%)	5,1	6,9
Ácido oléico (%)	41,1	43,1
Ácido linoléico (%)	38,1	34,3
Ácido linolênico (%)	0,2	-
Outros ácidos (%)	-	1,4
Ácidos saturados (%)	19,4	-
Ácidos insaturados (%)	80,6	-

Fonte: SATURNINO et al. (2005a)

As excelentes perspectivas da utilização desta euforbiácea para a produção de biodiesel são citadas por Teixeira (2005), relatando que a mesma já está sendo explorada com bastante êxito na Índia, no Continente Africano e na América Central. A produção anual de sementes de pinhão-mansão, em plantio com espaçamento de 3,0 x 3,0 m, pode atingir de 3,0 a 4,0 t ha⁻¹, ou mais, dependendo do sistema de cultivo (BRASIL, 1985). Carnielli (2003) destaca que o pinhão-mansão produz no mínimo duas toneladas de óleo por hectare por ano, apresentando rendimento de quatro a cinco quilos de frutos por planta e teor de óleo na semente de 35 a 40 %.

As características físico-químicas do óleo de pinhão-mansão, segundo Reyadh (1999 *apud* SATURNINO et al., 2005a), são comparáveis às especificações padronizadas para o óleo diesel (Tabela 3).

Tabela 3 – Especificação padrão dos óleos de pinhão-mansão e diesel

Especificações	Padrão do óleo	
	Pinhão-mansão	Diesel
Gravidade específica	0,9186	0,82-0,84
Ponto de fulgor	240/110°C	50°C
Resíduo de carbono	0,64	0,15 ou menos
Índice de cetano	51,0	Acima de 50,0
Ponto de destilação	295°C	350°C
Viscosidade quinemática	50,73cs	Acima de 2,7cs
Enxofre	0,13%	1,2% ou menos
Valor calorífico	9.470 kcal/kg	10.170 kcal/kg
Ponto de fluidez	8°C	10°C
Cor	4,0	4 ou menos

Fonte: SATURNINO et al. (2005a)

O Centro de Pesquisa e Desenvolvimento Leopoldo Américo Miguez de Mello (Cenpes), centro de pesquisa da Petrobrás, realizou avaliações a partir da transesterificação do óleo de pinhão-mansão, a 60° C, utilizando 1% de catalisador e 80% de etanol, que o consagraram como de excelente qualidade, com todos os parâmetros atendendo às normas da Agência Nacional do Petróleo (ANP), notadamente de baixa viscosidade (4,8 cSt), densidade, cor, cetano, insaturação e alto grau de pureza (Tabela 4) (HEIFFIG e CÂMARA, 2008). Outro estudo que demonstra o

potencial da espécie e fornece informações que podem servir de subsídios para a inserção do pinhão-mansão na cadeia produtiva do biodiesel foi realizado por Melo et al. (2006). Neste trabalho os pesquisadores verificaram que através do uso da extração com hexano as amêndoas das sementes de pinhão-mansão apresentaram um teor médio de óleo de 42%, em base seca. Observaram uma variabilidade de 3% no teor de óleo entre diferentes tipos de amostras que foi atribuída a diversos fatores, tais como: variabilidade genética, graus de maturação variados e diferentes estados de conservação dos frutos. O óleo obtido apresentou cor amarelada. Para a produção de biodiesel, a esterificação mostrou-se satisfatória para a redução da acidez livre na amostra de óleo industrial. O biodiesel produzido por transesterificação metílica apresentou massa específica, viscosidade cinemática, ponto de fulgor e índice de acidez dentro dos padrões estabelecidos pela ANP tanto para o B100 como para o óleo diesel de petróleo.

Tabela 4 – Propriedades do biodiesel produzido a partir do óleo vegetal de pinhão-mansão

Parâmetros	Resultados
Viscosidade	4,8 Cp
Umidade	0,08% (KF)
Ésteres	100%
Cetano	54

Fonte: HEIFFIG e CÂMARA, (2008)

Conforme Berchmans e Hirata (2008), em muitos casos a qualidade do óleo bruto da semente do pinhão-mansão pode deteriorar-se gradualmente devido ao manuseio e/ou condições de armazenamento inadequados. A manipulação indevida deste óleo pode causar um aumento do teor de água e a exposição ao ar livre e a luz solar por longos períodos pode afetar a concentração de ácidos graxos livres (AGL), aumentando significativamente o nível destes AGL, acima de um por cento, considerando também que a quantidade de AGL na planta pode variar e depende da qualidade da matéria-prima. Altos teores de ácidos graxos livres (>1% w/w) favorecem a formação de sabão, tornando extremamente difícil a separação de produtos, resultando em um baixo rendimento na produção de biodiesel. Os teores de AGL e umidade têm efeitos significativos nas reações de transesterificação de glicerídeos com álcool usando um catalisador. Sendo assim, estes pesquisadores desenvolveram uma técnica alternativa, para produção de

biodiesel, a partir de óleo bruto de sementes de *J. curcas* com alto teor de ácidos graxos livres (15%). Utilizando-se desta técnica, que torna o processo mais rápido que a transesterificação, o nível elevado de ácidos graxos livres foi reduzido para menos de um por cento, tornando ainda mais viável o uso do óleo de pinhão-manso para a produção de biodiesel.

Estudos realizados no Estado do Paraná mostraram que grande parte do Norte, Litoral e partes das regiões Oeste e do Alto Ribeira apresentaram baixo risco de perdas na produção de pinhão-masno por geadas. Esses resultados dão suporte para definir as regiões aptas para a expansão da cultura do pinhão-manso neste Estado (ANDRADE et al., 2007). Na região Nordeste, o pinhão-manso, pelo emprego do seu óleo e possibilidade de uso na produção do biodiesel, grande rusticidade, boa adaptação às variações do meio ambiente e pelo papel que pode exercer na proteção do solo, podendo ser cultivado, ainda, em consórcio com outras culturas de importância econômica como o amendoim, algodão entre outras, tem grande importância para o melhor aproveitamento agrícola da região semi-árida, sendo uma opção para a economia dessa região. O aumento das áreas de plantio pode auxiliar na fixação de mão-de-obra na zona rural pela geração de emprego e fornecer matéria prima para a indústria. No entanto, a falta de conhecimento científico sobre essa cultura dificulta sua divulgação, fazendo-se necessário, estudos por parte de instituições de pesquisa que possibilitem fazer recomendações técnicas seguras sobre seu cultivo, colheita e aproveitamento industrial (ARRUDA et al., 2004).

Diante da necessidade de diversificar as fontes de renda e a produção da agricultura familiar, diversas instituições e organizações estão trabalhando a fim de encontrar alternativas viáveis para o setor. Ações do Governo Federal, coordenadas pelo do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) estão viabilizando o zoneamento agrícola das culturas oleaginosas para as diversas regiões do Brasil. Projetos tecnológicos estão sendo fomentados pelo Ministério da Ciência e Tecnologia e suplementados por meio da atuação de empresas estatais de pesquisa agropecuária e universidades. O MAPA por meio da Instrução Normativa nº 04 de 14 de janeiro de 2008, autorizou a produção e a comercialização de sementes e/ou mudas de *J. curcas* condicionadas a assinatura de um Termo de Compromisso e Responsabilidade firmado entre o produtor do material propagativo e o interessado no plantio (BRASIL, 2008). No Cone Leste paulista o pinhão-manso, devido suas características, está sendo considerado alternativa para a região, por ser perene se adapta à topografia de mar de morros limitante às culturas anuais, por não servir de alimento para os animais e não se prestar ao consumo humano devido à presença de

substâncias tóxicas no óleo. Os produtores reunidos em uma associação com sede no município de Taubaté – SP somam 60 ha de área experimental cultivada em 20 municípios. Em uma pesquisa conduzida na Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA), Setor de Fitotecnia do Pólo Regional do Vale do Paraíba (PRDTA/VP), Pindamonhangaba – SP, com pinhão-manso, avaliando seis acessos (140 plantas) em sistema orgânico focada na conservação ambiental, segurança alimentar e balanço energético, intercalado com culturas anuais (girassol e milho-verde) e adubação verde simultânea (feijão-de-porco e calopogônio) na projeção da copa, avaliou produção, ocorrência de insetos e doenças e o aporte de nutrientes na cultura via adubação verde e insumos utilizados. Com os resultados deste estudo os autores concluíram que: (1) a utilização de culturas consortes nos primeiros anos de implantação da espécie assegura a produção de alimentos, renda extra ao agricultor e promove o aumento da biodiversidade da unidade produtiva; (2) a variabilidade fenotípica de *J. curcas* demanda o melhoramento genético para a seleção de plantas produtivas, resistentes às fitomoléstias e adaptadas à região e que (3) os adubos verdes aportaram nutrientes e promoveram a conservação do solo (CASTRO et al., 2008).

Famílias do Vale do Rio Pardo, Rio Grande do Sul, vêm enfrentando dificuldades para garantir sua reprodução social, o que tem estimulado a busca por maior diversificação da produção e novas alternativas de renda. Neste contexto, surge o pinhão-manso, planta de ocorrência espontânea na região e com potencial da produção de óleo. Nesta localidade, essa cultura é mais uma alternativa na geração de emprego e renda. A planta apresenta potencial que vem despertando a atenção de agricultores e investidores do Brasil e exterior para a produção de biodiesel (ÁVILA et al., 2009).

2.2 Diversidade e Melhoramento Genético do Pinhão-manso

Uma das principais preocupações de melhoristas de plantas, em face do aumento da erosão dos recursos genéticos vegetais, é a diminuição ou perda variabilidade genética de espécies cultivadas e seus parentes silvestres, bem como de variedades locais, resultando em estreitamento da base genética de uma espécie (HALLAUER E MIRANDA, 1988). Segundo Casali (1969 *apud* SILVA et al., 2001) a vulnerabilidade resultante do estreitamento da base genética só pode ser evitada com variabilidade, a qual depende dos recursos genéticos disponíveis, ou seja, do germoplasma da espécie. Diante da necessidade de manter esta

variabilidade os bancos de germoplasma funcionam como um método de conservação *ex situ*, em que amostras da variabilidade genética de determinada espécie é conservada em condições controladas, fora do *habitat* da espécie (NASS, 2001).

Visando o melhoramento genético e desenvolvimento de genótipos superiores de pinhão-manso, acessos de *J. curcas* L. têm sido introduzidos para ampliação do banco ativo de germoplasma da espécie. Para o sucesso de um programa de melhoramento genético desta euforbiácea é necessário a obtenção da máxima variabilidade genética disponível e avaliação de acessos divergentes com características desejáveis, tais como: alta produtividade de sementes; alta taxa de flor feminina em relação à flor masculina, porte reduzido, resistência a insetos e doenças, uniformidade e precocidade de maturação, resistência/tolerância à seca, e, principalmente, alto teor e melhoramento das propriedades químicas e físicas do óleo. Por isso é muito importante o levantamento de informações quanto à diversidade do germoplasma disponível para o estabelecimento de coleções com variação genética representativa do gênero *Jatropha*. O germoplasma disponível no mundo necessita de informações quanto à base genética, apresenta produção variável, alta vulnerabilidade as pragas e baixa diversidade genética. Poucas variedades têm sido selecionadas em diferentes países: a variedade Cabo Verde, que segundo alguns autores, foi distribuída por todo o mundo; a variedade Nicarágua, com poucos porém grandes frutos e a variedade mexicana não tóxica desprovida de ésteres de forbol, cujo óleo pode ser usado para consumo humano e a torta, rica em proteínas, para a ração animal. O melhoramento genético de *Jatropha* tem como opções a utilização do método convencional aproveitando-se a variabilidade pré-existente ou a geração de variabilidade por hibridações. Para usar a variabilidade genética pré-existente é preciso estudos da extensão desta variabilidade no germoplasma disponível, para isto são utilizadas ferramentas moleculares, ao mesmo tempo em que são feitos estudos para caracterização fitoquímica do óleo e da torta (MARQUES e FERRARI, 2008).

2.3 Análises Genética de Populações Naturais e Artificiais de Plantas

Uma população, do ponto de vista genético, é definida como um conjunto de indivíduos de uma mesma espécie, que compartilham o mesmo *pool* gênico, isto é, indivíduos que compartilham seus genes através de reprodução (FALCONER e MACKAY, 1989). Os parâmetros descritivos para avaliar a estrutura genética de uma população são as frequências alélicas e genótípicas, que se referem, respectivamente, à quantidade observada de um determinado alelo frente ao total de alelos da população e a quantidade observada de indivíduos com um determinado genótipo frente ao total de indivíduos da população. As heterozigosidades esperada (H_e) e observada (H_o) e a diversidade genética são as medidas da variabilidade genética da população, que permitem identificar o número de indivíduos heterozigotos, bem como a quantidade de indivíduos homozigotos diferentes (WEIR, 1996).

Para quantificar a variabilidade genética em populações de plantas, os parâmetros genéticos mais utilizados são o número de alelos por loco, a heterozigosidade esperada e a observada (PINTO, 2001). A alteração genética de uma população pode ser avaliada pela mudança nas suas frequências gênicas, o que torna a estimativa da frequência de heterozigotos fundamental nos estudos evolutivos (NEI, 1978). A frequência de um determinado alelo em um grupo de indivíduos diplóides é igual a duas vezes o número de indivíduos homozigóticos para o alelo, mais o número de indivíduos heterozigóticos, dividido por duas vezes o número de indivíduo na amostra, em virtude de cada indivíduo carregar dois alelos em um loco. Em amostras grandes é maior a chance de se detectar alelos raros, pois o número de alelos observados por loco aumenta em função do tamanho da amostra. Conforme Weir (1996), conhecer a frequência dos heterozigotos é importante na medida em que cada heterozigoto carrega alelos distintos, demonstrando a existência de variação genética na população.

Forças evolutivas tais como: mutação, migração, seleção e deriva genética atuam dentro do contexto de cada espécie influenciando a estrutura genética da população, ou seja, interferindo na distribuição heterogênea (não aleatória) dos alelos e genótipos no espaço e tempo (HAMRICK, 1982). A migração ou fluxo gênico atua promovendo homogeneidade genética, enquanto que mutação, deriva genética e seleção atuam favorecendo adaptações às condições ambientais locais que podem levar à diferenciação genética de populações (FUTUYMA, 1998).

O sistema pelo qual a espécie se reproduz influencia diretamente em suas frequências alélica e genotípica. Uma população de tamanho infinito, que pratica cruzamentos ao acaso, está em equilíbrio de Hardy-Weinberg quando suas frequências alélicas e genotípicas não se alteram nas sucessivas gerações, e há total ausência de migração, mutação, seleção e deriva genética. Através deste princípio é possível o cálculo da frequência dos genótipos, a partir das frequências dos alelos (FUTUYMA, 1993).

A principal ferramenta que alavancou o estudo da genética de populações, e que também permite e viabiliza a avaliação de acessos em bancos de germoplasma, possibilitando a caracterização da estrutura genética entre e dentro de populações ou grupos é o uso de marcadores moleculares.

2.4 Marcadores Moleculares

O estudo da diversidade genética é o processo pelo qual a variação entre populações, entre grupos ou entre indivíduos de um grupo é analisada por meio de um método específico ou de uma combinação de métodos. Os dados normalmente envolvem um número grande de mensurações baseadas em dados morfológicos e de passaporte, dados bioquímicos (via isoenzimas), citológicos e, recentemente, dados baseados em técnicas moleculares de DNA, que permitem diferenciação mais realística dos genótipos (BORÉM e CAIXETA, 2006). Os marcadores moleculares acessam o genoma, evitando o efeito ambiental e conseqüentemente erros de identificação (BORBA et al., 2005).

Segundo Mاتيoli e Passos-Bueno (2001), a variabilidade genética é um instrumento de investigação muito importante para os pesquisadores em seus estudos quando desejam verificar afinidades e limites entre as espécies, detectar modos de reprodução e estrutura familiar, estimar níveis de migração e dispersão nas populações e até mesmo para ajudar na identificação de restos de espécies ameaçadas de extinção. Os dados básicos para esses estudos, denominados marcadores moleculares, são locos gênicos que apresentam alguma variabilidade.

As tecnologias de análise molecular da variabilidade do DNA permitem determinar pontos de referência nos cromossomos, tecnicamente denominados “marcadores moleculares”. Marcador molecular é todo e qualquer fenótipo molecular proveniente de um gene expresso,

como no caso de isoenzimas, ou de um segmento específico de DNA (correspondendo a regiões expressas ou não do genoma).

A revolução neste plano se iniciou na década de 60 com o descobrimento e utilização de marcadores isoenzimáticos (MARKERT e MOLLER, 1959), ampliando vastamente o número de marcadores genéticos e possibilitando a aplicação da técnica à praticamente todas as espécies de plantas. A partir da década de 70, com a descoberta das enzimas de restrição na década anterior, surgiu o primeiro marcador molecular que possibilitou detectar diferenças entre indivíduos através de cortes no DNA estudado, o RFLP – *Restriction Fragment Length Polymorphism* (polimorfismo no tamanho de fragmentos de restrição). Na década de 80, foi desenvolvido pelo pesquisador Kary Mullis uma tecnologia simples e eficiente que é a reação em cadeia da polimerase – PCR (Polymerase Chain Reaction). Através deste processo é possível multiplicar *in vitro* e em escala exponencial cópias de um segmento específico de DNA, na presença da enzima DNA polimerase. O desenvolvimento desta técnica levou Kary Mullis a ganhar o prêmio Nobel de química em 1993, devido ao impacto causado pela PCR e dos métodos dela derivados (NOBELPRIZE, 1993). A técnica de PCR promoveu também o surgimento de novos marcadores moleculares tais como os marcadores RAPD – *Random Amplified Polymorphic DNA* (DNA polimórfico amplificado arbitrariamente), STS – *Sequence Tagged Sites* (sítios marcados por sequências), SCARS – *Sequence Characterized Amplified Regions* (regiões amplificadas caracterizadas por sequências), AFLP – *Amplified Fragment Length Polymorphisms* (polimorfismos de comprimento de fragmentos amplificados), SNPs – *Single Nucleotide Polymorphisms* (polimorfismo de um único nucleotídeo), SSRs (*Simple Sequence Repeats*) e ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*), entre outros (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998; BORÉM e CAIXETA, 2006). SSR e ISSR foram os marcadores moleculares utilizados como ferramentas neste estudo, então para melhor entendimento da metodologia adotada e das formas de análises, serão abordados de forma detalhada mais adiante.

Marcadores moleculares podem ser utilizados habitualmente em programas de melhoramento genético, tanto para caracteres quantitativos como qualitativos, seja em investigação básica ou aplicada. Diversos empregos de marcadores em melhoramento de plantas podem ser distribuídos em aplicações cujos resultados apresentam expectativas de curto, médio e longo prazo. No melhoramento clássico as aplicações em curto prazo incluem, basicamente, a identificação e a discriminação de genótipos. Nas aplicações analíticas de médio e longo prazo,

os marcadores permitem quantificar a variabilidade genética existente ao nível de sequência de DNA e correlacioná-la com a expressão fenotípica em procedimentos de mapeamento genético (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998).

A importância de se conhecer a variabilidade dos acessos de um banco de germoplasma, conforme Hosbino et al. (2002), é tornar possível o acompanhamento da manutenção do mesmo durante a multiplicação dos acessos e melhorar a amostragem destes. As atividades de um banco de germoplasma são inúmeras: desde a aquisição do germoplasma, passando por sua caracterização, avaliação, distribuição, e finalmente documentação dos acessos existentes em bancos de germoplasma. A caracterização e a avaliação talvez sejam as mais importantes para o melhorista de plantas. O elevado nível de resolução genética e confiabilidade obtida por meio da análise com marcadores moleculares possibilitam a discriminação entre linhagens ou variedades com base genética estreita, o que é comum entre variedades comerciais (BORÉM, 2005). Em um estudo realizado com o objetivo de avaliar a variabilidade em 256 acessos de pinhão-manso, do banco de germoplasma da Embrapa Algodão, multiplicados nos campos experimentais da Embrapa em Patos e Itatuba – PB, Brasil, provenientes do Brasil (Pernambuco, Tocantins, Paraíba, Ceará), El Salvador, Colômbia e África, considerando os seguintes descritores: altura da planta; diâmetro do caule; número de ramos e entrenós, verificou-se diversidade genética relevante entre os acessos com base nas características agromorfológicas, entretanto, é importante saber se esta variabilidade está relacionada com o genótipo das plantas ou com o ambiente onde estão sendo cultivadas, tornando útil estas informações em futuras pesquisas com a espécie. Uma das ferramentas mais eficiente e rápida para caracterizar indivíduos a fim de se determinar a diversidade genética disponível e assim fornecer subsídios para programas de melhoramento é o marcador molecular (SILVA et al., 2008).

Atualmente, os marcadores moleculares se mostraram uma importante ferramenta na estimativa da diversidade genética existente na coleção, nas relações genéticas entre materiais para definição de direção de cruzamentos ou seleção de progenitores, além de poderem acompanhar a introgressão de genes durante o processo de melhoramento em si (BORÉM e CAIXETA, 2006). Muitas pesquisas vêm sendo realizadas utilizando os marcadores moleculares para estimar a diversidade genética existente nas coleções. Gois et al. (2006) realizaram um estudo com o objetivo de avaliar a variabilidade genética de 15 acessos de pinhão-manso dos Estados de Minas Gerais, Goiás, Espírito Santo e Sergipe, utilizando-se marcadores

isoenzimáticos. Os dados permitiram identificar os acessos mais divergentes no germoplasma avaliado.

A variabilidade de plantios de pinhão-mansão de 16 municípios no entorno de Viçosa, Minas Gerais, foi quantificada por marcadores moleculares RAPD. Mudas de dois genótipos de pinhão manso, cujas sementes foram plantadas em mais de mil hectares daqueles municípios, tiveram seu DNA extraído e analisado e foram constatados 85% de similaridade genética entre os estes genótipos, levando os pesquisadores a alertar sobre a necessidade de ampliação da base genética das plantações, pela inclusão de novos genótipos nos futuros plantios (DIAS et al., 2007). Em outro estudo realizado por Ranade et al. (2008) foram avaliados 22 acessos, divididos em 5 grupos, coletados em diversas regiões da Índia, utilizando-se análises com marcadores RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) e com marcadores DAMD (*Directed Amplification of Minisatellite DNA*). Este estudo sugeriu que a espécie, cuja introdução é relativamente recente no país, mostrou uma diversidade genética adequada na Índia, e que os métodos foram úteis e forneceram ferramentas rápidas e importantes para analisar a diversidade das poucas linhagens parentais dentro das coleções disponíveis para experimentação de adaptabilidade e para promover a melhoria destas plantas. Tatikonda et al. (2009) utilizaram marcadores AFLP na caracterização de uma coleção de germoplasma elite, na Índia, e a diversidade molecular estimada neste estudo concordou com o conjunto de dados em outras características morfológicas/agronômicas que serão úteis para selecionar acessos adequados para programas de melhoramento da espécie por meio convencional, bem como em abordagens de melhoramento molecular. Wen et al. (2010) identificaram 241 marcadores SSR de regiões expressas (EST-SSR) e de DNA genômico (G-SSR) que poderão ser úteis em mapeamento genéticos e em análises de locos quantitativos de características de importância agronômicas. A diversidade genética avaliada neste estudo foi maior entre grupos do que a diversidade avaliada dentro dos grupos.

2.4.1 Marcadores microsatélites

Segundo Hamada et al. (1982) e Tautz e Renz (1984), os genomas dos eucariotos estão densamente povoados por diferentes classes, mais ou menos complexas, de sequências repetidas, origem do termo SSR – *Simple Sequence Repeats*, ou STR – *Short Tandem Repeats*, mais tarde

chamados de marcadores Microssatélites. São repetições de pequenas sequências de um a seis nucleotídeos adjacentes repetidos em linha, sendo encontrados amplamente distribuídos pelo genoma da maior parte dos eucariotos (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998; TOTH et al., 2000; ZANE et al., 2002). Foram descritos em plantas pela primeira vez por Condit e Hubbell (1991), que detectaram a presença das repetições (AC)_n e (AG)_n. Morgante e Olivieri (1993) constatarem em 34 espécies vegetais a presença de microssatélites, sendo o dinucleotídeo AT o elemento repetido mais comum, também constatarem que estes marcadores estão em menor frequência que nos vertebrados, mas em maior frequência que nos invertebrados e fungos. Estudos apontam para o *slippage*, ou o deslizamento da polimerase, como o principal mecanismo por trás do surgimento e amplificação destas sequências repetitivas nos genomas, gerando alta taxa de mutação dos microssatélites, numa frequência de 10^{-3} e 10^{-4} por loco por gameta em cada geração. Acredita-se que durante a replicação de uma região repetitiva, as fitas de DNA separam-se e unem-se novamente de forma incorreta, o que geraria cópias de trechos de DNA (alelos) com diferentes tamanhos ou números de repetições de um determinado motivo no próximo ciclo de replicação, por meio da inserção ou deleção de uma unidade de repetição. O problema também pode estar associado ao sistema de reparo pela DNA polimerase ou ainda, ser consequência do processo de recombinação (SCHLÖTTERER E TAUTZ, 1992; FIELD e WILLS, 1996). Durante o processo de recombinação o *crossing-over* desigual pode ser responsável pela alta taxa de polimorfismo destes marcadores, que por problemas no pareamento dessas sequências durante o quiasma, aumenta a taxa de mutação das regiões microssatélites e são estas mutações que tornam estes marcadores tão informativos (STRAND et al., 1993; SCHLÖTTERER et al., 1998). O polimorfismo de um loco microssatélite é resultado do número de repetições do motivo que o caracteriza. Portanto, os diferentes alelos que um loco microssatélite pode apresentar distinguem-se uns dos outros pelo número de repetições que apresentam. Adotemos como exemplo, um loco em que o dinucleotídeo “CG” é a unidade de repetição, o polimorfismo que distinguirá os alelos deste loco dependerá da presença de números variáveis dessa unidade de repetição, então um alelo pode ser definido, por exemplo, pela ocorrência de 20 unidades de “CG” adjacentes repetidos lado a lado, enquanto que outro alelo deste loco pode apresentar apenas 18 repetições.

Chambers e Macavoy (2000) sugerem que são necessários, para iniciar um processo de origem de um microssatélite, no mínimo oito nucleotídeos repetidos em *tandem*.

Os microssatélites são classificados conforme a composição das sequências repetidas: (a) repetições perfeitas, quando não apresentam nenhuma interrupção, por exemplo: GTGTGTGTGTGTGTGT; (b) repetições imperfeitas, quando são interrompidas por bases que não correspondem ao motivo, por exemplo: GTGTGTGTAGTGTGTT; (c) repetições compostas, quando duas ou mais repetições (classes) de microssatélites estão dispostas adjacentes, por exemplo: GTGTGTGTGTGTCACACACACACA (BORÉM e CAIXETA, 2006).

Em geral, apesar das sequências microssatélites variarem de um indivíduo para o outro, as sequências de DNA que as flanqueiam são bastante conservadas entre indivíduos da mesma espécie. Conhecendo as regiões é possível desenhar *primers* específicos para essas regiões adjacentes às sequências microssatélites, possibilitando a amplificação via PCR dos fragmentos que contêm o DNA repetitivo em diferentes genótipos. Os produtos da amplificação podem ser visualizados em gel de poliacrilamida desnaturante ou não desnaturante, em gel de agarose de alta resolução ou por meio de *primers* fluorescentes em sequenciador automático, e o polimorfismo entre as bandas será decorrente dos tamanhos diferentes de elementos simples repetidos. Cada segmento de DNA representa um alelo daquele loco específico (SOUZA, 2001; ALVES, 2002; BORÉM e CAIXETA, 2006). O alto poder discriminatório deste marcador é uma característica importante que merece destaque, motivo pelo qual é amplamente utilizado em estudos de genética de populações, análises de paternidade e forense (OLIVEIRA et al., 2006).

Segundo Slatkin (1995) são marcadores ideais para estudos de genética e evolução de populações naturais devido ao alto poder discriminatório, à robustez, confiabilidade, praticidade operacional e por serem marcadores mais informativos geneticamente. Rafalski et al. (1996) citam que dentre os marcadores baseados em PCR, os SSR são os que mais se aproximam do marcador ideal, tendo uma ampla aplicabilidade em estudos de parentesco, fluxo gênico e estrutura genética de populações naturais, por apresentarem um padrão de herança mendeliana aliado as elevadas taxas de polimorfismo, capazes de gerar um alto conteúdo informativo. Os microssatélites apresentam características altamente desejáveis (SUGANUMA e CIAMPI, 2005): são marcadores codominantes, ou seja, ambos os alelos de um indivíduo heterozigoto podem ser visualizados no gel; estão ampla e uniformemente distribuídos pelo genoma dos eucariotos; são altamente multialélicos; são amplificados via PCR, o que facilita sua obtenção mesmo com poucas quantidades de DNA; uma vez desenvolvidos os *primers* que amplificam tais regiões do genoma, estes podem ser fácil mente compartilhados entre laboratórios; *primers* marcados com

fluorescência apresentam a vantagem de possibilitarem sistema multiplex, o que permite avaliar rapidamente um grande número de indivíduos para um grande número de locos em pouco tempo.

O emprego da tecnologia dos microssatélites envolve algumas limitações, como a grande quantidade de trabalho necessário para o desenvolvimento de *primers* específicos para os locos de microssatélites de cada espécie. Entretanto, ocorre conservação de sítios microssatélites entre espécies relacionadas, possibilitando aproveitar *primers*, denominados heterólogos, que foram desenvolvidos para uma espécie e empregá-los nas demais espécies do gênero (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998).

2.4.1.1 Análise da estrutura genética com marcadores codominantes

Através do uso de marcadores codominantes a caracterização da estrutura genética entre populações, isto é, o grau de diferenciação populacional pode ser abordado de três modos diferentes, sendo eles: estatísticas F de Wright; análise da diversidade gênica em populações subdivididas; e os coeficientes de co-ancestralidade de Cockerham. As estatísticas F de Wright possibilitam a caracterização da distribuição da variabilidade genética entre as populações (F_{ST}), bem como dos níveis médios de endogamia ao nível populacional (F_{IS}) e total (F_{IT}), (WRIGHT, 1965). A avaliação da divergência em diferentes níveis de hierarquia e a obtenção de estimativas de endogamia, a partir de uma base não enviesada, é obtida através dos coeficientes de co-ancestralidade de Cokerham (θ), (COCKERHAM, 1969; VENCOSKY, 1992; WEIR, 1996). E através da análise da divergência gênica em populações subdivididas é possível a comparação dos níveis de heterozigosidade entre e dentro das populações, bem como a obtenção de uma estimativa de divergência, a partir de uma base diferente daquela que fundamenta as estimativas de F_{ST} e θ (NEI, 1977).

São três as formas de estimar as estatísticas F :

- De acordo com Wright (1965):

$$1 - \hat{F}_{IT} = (1 - \hat{F}_{IS})(1 - \hat{F}_{ST})$$

$\hat{F}_{IT}$ = índice de fixação ou coeficiente de endogamia para o conjunto das populações (devido ao sistema reprodutivo e subdivisão);

$\hat{F}_{IS}$ = índice de fixação ou coeficiente de endogamia intrapopulacional (devido ao sistema reprodutivo);

$\hat{F}_{ST}$ = índice de fixação ou coeficiente de endogamia entre populações (devido à subdivisão);

- Coeficientes de co-ancestralidade de Cockerham (COCKERHAM, 1969):

F de Cockerham $\approx F_{IT}$ de Wright: é a correlação entre alelos dentro de indivíduos em todas as populações. É o coeficiente de endogamia que se refere aos indivíduos em relação ao conjunto de populações, reunindo a informação dos índices de fixação F_{ST} e F_{IS} .

θ de Cockerham $\approx F_{ST}$ de Wright: é a correlação dos alelos dentro de indivíduos na mesma população. É o coeficiente de co-ancestralidade.

f de Cockerham $\approx F_{IS}$ de Wright: correlação dos alelos dentro de indivíduos dentro das populações.

- De acordo com Nei (1977):

$$\hat{F}_{IT} = 1 - \frac{\hat{H}_{ot}}{\hat{H}_{et}}$$

$$\hat{F}_{IS} = 1 - \frac{\hat{H}_{ot}}{\hat{H}_{ei}}$$

$$\hat{F}_{ST} = 1 - \frac{\hat{H}_{ei}}{\hat{H}_{et}}$$

em que:

$$\hat{H}_{ot} = \frac{\sum \sum \hat{x}_{il}}{l_s}$$

$$\hat{H}_{ei} = 1 - \frac{\sum \sum \hat{x}_{ilk}^2}{l_s}$$

$$\hat{H}_{et} = 1 - \frac{\sum \left(\frac{\sum \hat{x}_{ilk}}{s} \right)^2}{l}$$

Sendo:

$\hat{H}_{et}$ = heterozigosidade esperada total;

$\hat{H}_{ot}$ = heterozigosidade observada total;

$\hat{H}_{ei}$ = heterozigosidade esperada média total;

$\hat{x}_{il}$ = frequência de heterozigotos do loco l na população i;

$\hat{x}_{ilk}$ = frequência do alelo k do loco l na população i;

s = número de populações;

l = número de locos.

Recentemente, uma estatística análoga ao θ_p de Cockerham tem sido utilizada em estudos com marcadores microssatélites. Trata-se da estatística R_{ST} que comporta em seu cálculo o *stepwise model* proposto por Slatkin (1995) em que a mutação para um novo alelo de um determinado marcador microssatélite ocorre em passos, assim alelos com tamanhos mais próximos são considerados mais similares do que os alelos com tamanhos mais distantes. A estatística R_{ST} é calculada da seguinte forma:

$$R_{ST} = \frac{\bar{S} - S_w}{\bar{S}}$$

Sendo:

S_w = duas vezes a média da variância estimada do tamanho do alelo encontrado dentro de cada população;

$\bar{S}$ = duas vezes a variância estimada do tamanho do alelo encontrado em todas as populações.

Locos que apresentam frequências semelhantes em diferentes populações apresentam baixos valores de R_{ST} , enquanto que aqueles que apresentam frequências gênicas muito distintas entre populações apresentam valores altos.

O uso de marcadores codominantes possibilita a obtenção de informações que fornecem subsídios para entender a dinâmica evolutiva das espécies auxiliando na adoção de estratégias de conservação e melhoramento genético, manejo de populações naturais, podendo determinar o impacto da influência antrópica na variabilidade das espécies (HAMRICK, 1989; SEOANE et al., 2001).

2.4.2 Marcadores *Inter Simple Sequence Repeats* (ISSR)

Alguns marcadores moleculares foram desenvolvidos, visando explorar as repetições microssatélites sem a necessidade de sequenciamento do DNA, pois uma das limitações da utilização dos marcadores microssatélites é a necessidade de conhecer as regiões que flanqueiam as repetições para que os *primers* possam se desenhados, entre estes marcadores baseados em microssatélites está o marcador ISSR ou também denominado AMP-PCR (*Anchored microsatellite-primed PCR*) (BORÉM e CAIXETA 2006).

Os marcadores ISSR foram desenvolvidos por Gupta et al. (1994) e Zietkiewicz et al. (1994) e são baseados na técnica de PCR. Os produtos da reação de PCR produzidos a partir de ISSR correspondem a sequências de tamanhos diferentes localizadas entre regiões repetidas de microssatélites, idênticas e orientadas em direções opostas. Foram descritos por Zietkiewicz et al. (1994), são uma das classes mais recentes e foram desenvolvidos partir da necessidade de explorar repetições microssatélites sem a utilização de sequenciamento do DNA. São considerados marcadores semi-arbitrários, obtidos por amplificação via PCR utilizando um único *primer* (oligonucleotídeos complementares para o microssatélite designado), geralmente longo com 14 nucleotídeos no mínimo, constituídos de sequências repetidas de di ou trinucleotídeos, podendo ser ou não ancorado em uma das extremidades (5' ou 3') com dois a quatro nucleotídeos (GUPTA et al., 1994; WOLFE et al., 1998). A ancoragem tem como função fixar o pareamento do *primer* em uma única posição no sítio alvo, o que resulta em baixo nível de pareamento inespecífico. O uso deste marcador torna desnecessário o conhecimento prévio das sequências que flanqueiam o microssatélite, demandam pouca quantidade de DNA por reação, são

facilmente detectados usando poucos equipamentos, são bastante variáveis e fornecem grande número de dados por um custo razoável para o pesquisador (WOLFE, 2005).

Os ISSR são marcadores dominantes e vêm sendo usados para a diferenciação rápida entre indivíduos aparentados, devido ao elevado grau de polimorfismo, alta reprodutibilidade e baixo custo (BORBA et al., 2005). O polimorfismo ocorre sempre que em um genoma esteja faltando a sequência repetida ou se tiver uma deleção ou uma inserção que modifica a distância entre as repetições. Para os *primers* ancorados na posição 5', polimorfismos ocorrem também, devido às diferenças no comprimento do microssatélite. As sequências de repetições e de nucleotídeos ancorados são selecionadas aleatoriamente. Os múltiplos fragmentos de comprimentos variados, gerados após a amplificação via PCR usando um *primer* único de ISSR, podem ser separados e visualizados utilizando técnicas como eletroforese em gel de agarose e detecção com brometo de etídeo ou com Azul de Bromofenol e *Blue Green*, (JOSHI et al., 2000), ou eletroforese em gel de poliacrilamida e coloração com nitrato de prata (BLAIR et al., 1999). O grau de polimorfismo obtido por esta técnica depende da natureza do *primer* (não ancorado, ancorado 3' ou ancorado 5'), da sequência de repetições, do método de detecção dos fragmentos e da natureza dos *primers*. Normalmente, *primers* com repetições (AG), (GA), (CT), (TC), (AC) e (CA), *primers* ancorados e detecção dos fragmentos amplificados por gel de poliacrilamida detectam alto polimorfismo quando comparados com outras condições de análise (REDDY et al., 2002).

Embora, ISSR sejam marcadores dominantes, ou seja, não permitem a diferenciação de indivíduos heterozigotos de homozigotos, têm a vantagem de analisar múltiplos locos em uma única reação, são rápidos e fáceis de trabalhar (GOULÃO e OLIVEIRA, 2001), e estudos de genética de populações, a sua dominância é considerada uma desvantagem (ZIETJIEWICZ et al., 1994), mas por serem abundantes no genoma dos eucariotos estes marcadores se mostram úteis em estudos populacionais (FANG e ROOSE, 1997; ESSELMAN et al., 1999). Tsumura et al. (1996) destacam que os ISSR são mais robustos porque apresentam maior superfície de ancoragem e possuem maiores temperaturas de reassociação, o que aumenta a reprodutibilidade dos produtos de ISSR.

No início o uso destes marcadores ficou restrito apenas a espécies de plantas cultivadas (WOLFF et al., 1995; TSUMURA et al., 1996; NAGAOKA e OGIHARA, 1997; PARSONS et al., 1997). Entretanto, devido à sua abundância e dispersão no genoma, estes marcadores têm sido

amplamente utilizados para estudar analogias entre duas populações muito relacionadas (REDDY et al., 1999). Nagaoka e Ogihara (1997) e Parsons et al. (1997) descrevem os marcadores ISSR como sendo mais polimórficos que os marcadores RAPD. *Primers* de ISSR também têm sido usados para caracterização e manutenção de germoplasma de cacau (CHARTERS e WILKINSON, 2000), para distinguir entre várias cultivares de crisântemo (WOLFF et al., 1995), e também para estudar a variabilidade genética de indivíduos de Artemísia (SHAFIE et al., 2009). A diversidade genética de catorze cultivares de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) foi acessada por trinta e sete *primers* de ISSR, dos quais, oito foram eficientes na amplificação do DNA das amostras analisadas, sendo sete *primers* suficientes para distinguir todas as cultivares de cana-de-açúcar envolvidas nas análises (ALMEIDA et al., 2009). Oliveira et al. (2010) avaliaram a variabilidade genética de 13 genótipos de cajazeira utilizando marcadores moleculares ISSR, com apenas sete *primers*, que amplificaram 43 bandas polimórficas, e possibilitaram a identificação de diferenciações entre os genótipos. Com os resultados, os pesquisadores confirmam que há presença de significativa variabilidade genética entre os genótipos estudados.

Portanto, mesmo não sendo um marcador altamente informativo, os marcadores ISSR vêm sendo utilizados em uma grande variedade de estudos mostrando seu potencial não somente para estudos de diversidade genética de plantas cultivadas, como também em estudos de análises filogenéticas, ou ainda, em genética de populações naturais e artificiais de plantas (WOLFE e LISTON, 1998).

2.4.2.1 Análise da estrutura genética utilizando marcadores dominantes

Uma alternativa para caracterização da estrutura genética entre populações ou grupos utilizando marcadores dominantes foi viabilizada pela introdução da estatística Φ , por Excoffier et al. (1992) e usada pela primeira vez, por Huff et al. (1993). Excoffier et al. (1992) desenvolveram uma análise de variância que incorporou informações sobre a divergência molecular de dados provenientes de haplótipos, derivada de uma matriz de distâncias quadradas entre todos os pares de haplótipos. Esta nova abordagem, denominada de análise de variância molecular (AMOVA), possibilita produzir estimativas dos componentes de variância das

análogas estatísticas F , chamada pelos autores de estatística Φ , refletindo a correlação da diversidade dos haplótipos em diferentes níveis de subdivisão hierárquica.

A AMOVA ajusta variados tipos de matrizes de entrada fornecidas por diversos tipos de marcadores moleculares e diferentes tipos de pressuposições evolutivas, sem modificar a estrutura básica da análise. Para o teste da significância dos componentes da variância e das estatísticas Φ , utilizam-se permutações. A base dessa análise de variância molecular é que as distâncias genéticas são tratadas como desvio da média de um grupo e utiliza os quadrados dos desvios como variância, permitindo a participação da variação genética entre e dentro das populações analisadas. Excoffier et al. (1992) mostram que a soma dos quadrados convencionais (SQ) podem ser escritas na forma de soma de quadrados de diferenças entre pares de observações. Com isso, os autores construíram uma análise de variância molecular hierárquica, partindo diretamente da matriz das distâncias quadradas de todos os pares de haplótipos. Os autores afirmam que a AMOVA é facilmente aplicável em diferentes situações e constitui uma estrutura coerente e flexível para análise de dados moleculares. Os níveis hierárquicos são mostrados na Tabela 5:

Tabela 5 – Esquema da análise de variância molecular (AMOVA)

Fonte de variação	GL	SQ	QM	E (QM)
Entre populações	P-1	SQa	QMa	$\sigma_b^2 + 2\sigma_a^2$
Dentro de populações	N-P	SQb	QMb	σ_b^2
Total	N-1			

$$\sigma^2 = \sigma_b^2 + 2\sigma_a^2$$

Sendo:

P = número total de populações;

N = número total de dados para dado haplótipo;

GL = graus de liberdade;

SQ = soma dos quadrados;

QM = quadrado médio;

E (QM) = esperança do quadrado médio;

σ^2 = variância.

Os componentes da variância de cada nível hierárquico são obtidos das esperanças dos quadrados médios. De acordo com Cockerham (1969), tem-se que:

$$\Phi_{ST} = \frac{\sigma_a^2}{\sigma^2}$$

Em que: Φ_{ST} = proporção da variabilidade molecular de haplótipos entre populações. Este índice também é denominado F_{ST} .

Outro tipo de análise em genética de populações é a utilização do índice de Shannon (LEWONTIN, 1972), comumente usado em estudos ecológicos para indicar a diversidade de espécies por área. Este índice é bastante interessante como medida de diversidade populacional, a partir de dados dominantes, em que não é possível detectar heterozigotos. O índice de Shannon da diversidade é dado pela expressão:

$$H = - \sum P_i . \log_2 P_i$$

Em que P_i é a frequência da presença ou ausência de uma dada banda.

O índice de Shannon não se baseia na heterozigosidade da população, e sim na frequência fenotípica da ocorrência do fragmento amplificado (presença ou ausência da banda) na população (YEH et al., 1995; GOULART et al., 2005).

A estrutura genética é estimada por meio de G_{ST} ou pela análise da variância molecular (AMOVA), ambos produzindo resultados semelhantes (NYBOM e BARTISH, 2000). Outros parâmetros genéticos geralmente analisados são o número efetivo de alelos (N_e) e a porcentagem de locos polimórficos.

2.5 Material e Métodos

2.5.1 Material vegetal utilizado para a caracterização da estrutura genética populacional da espécie *Jatropha curcas*

Foram estudadas 12 “populações” de pinhão-manso estabelecidas no campo experimental do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) da Unicamp utilizando locos microssatélites e ISSR. Estas populações estão sendo cultivadas no município de Paulínia, SP, numa altitude de 669 m, 22° 48’ latitude S e 47° 07’ longitude. As origens destas populações podem ser observadas na Tabela 6. Para a genotipagem foram utilizados 15 indivíduos de cada população, totalizando 180 indivíduos.

Tabela 6 – Origens das populações analisadas neste estudo, estabelecidas no campo experimental do CPQBA

Populações	Origem
Filomena / 2004 Bento / 2004 Oracília/ 2004 Paraguaçu / 2004 Gonçalo / 2004	As sementes destas cinco populações são originadas de Janaúba, região norte de Minas Gerais, num raio de 100 km.
CPQBA	Sementes originadas de uma planta do Instituto Agrônômico de Campinas (IAC), São Paulo.
Socorro	Sementes originadas de uma planta de Socorro, São Paulo.
Glyn	Sementes originadas de um lote enviado pelo site “pinhaomanso.com.br”.
Fortaleza	Sementes originadas de uma feira em Fortaleza, Ceará.
Camboja	Sementes originadas do Camboja, país asiático da Indochina.
UFSCAR	Sementes originadas da Universidade Federal de São Carlos, São Paulo.
Canadá	Sementes originadas do Canadá.

2.5.2 Material vegetal utilizado para avaliar a diversidade genética entre acessos de pinhão-mansos de bancos de germoplasma

Visando avaliar a diversidade genética entre acessos de pinhão manso, utilizando-se para isso marcadores SSR e ISSR, foram estudados 29 acessos de *J. curcas* (Tabela 8), que foram divididos em dois grupos, sendo um grupo formado por um indivíduo de cada população do Banco de Germoplasma do CPQBA, portanto, 12 indivíduos, e o outro grupo formado por 17 indivíduos provenientes do Banco Ativo de Germoplasma (Tabela 7) localizado no Departamento de Engenharia Agrônômica da Universidade Federal de Sergipe – UFS, no município de São Cristóvão – SE, latitude 10° 55’ 43” S e longitude 37° 06’ 10” W.

Tabela 7 – Identificação dos acessos de pinhão-manso, estabelecidos no campo experimental da UFS

Acesso	Código	Origem
PM 01	JCUFLA001(01)	Minas Gerais
PM 02	JCUFLA001(02)	Minas Gerais
PM 03	JCUFLA001(03)	Minas Gerais
PM 04	JCUFLA001(04)	Minas Gerais
PM 05	JCUFLA001(05)	Minas Gerais
PM 06	JCUFLA001(06)	Minas Gerais
PM 07	JCUFLA001(07)	Minas Gerais
PM 08	JCUFLA001(08)	Minas Gerais
PM 09	JCUFLA001(09)	Minas Gerais
PM 10	JC016URVSHGO	Goiás
PM 11	JC011URVGO	Goiás
PM 12	JC012URVMG	Minas Gerais
PM 13	JC013URVGVGO	Goiás
PM 14	JC014URVES	Espírito Santo
PM 15	JC015URVSHGO	Goiás
PM 16	JC016URLAGSE	Sergipe
PM 17	JC017URBAHBA	Bahia

Tabela 8 – Identificação dos acessos de pinhão-mansão, originados dos bancos de germoplasma

Número de identificação dos acessos	Acessos
01	CPQBA 36 (1)
02	ORACÍLIA 39 (7)
03	GONÇALO 34 (11)
04	FILOMENA 38 (13)
05	SOCORRO 37 (2)
06	GLYN 23 (11)
07	FORTALEZA 26 (1)
08	BENTO 37 (2)
09	PARAGUAÇU 34 (1)
10	CAMBOJA (5)
11	UFSCAR (4)
12	CANADIA (24)
13	JCUFLA001 (01)
14	JCUFLA001 (02)
15	JCUFLA001 (03)
16	JCUFLA001 (04)
17	JCUFLA001 (05)
18	JCUFLA001 (06)
19	JCUFLA001 (07)
20	JCUFLA001 (08)
21	JCUFLA001 (09)
22	JC016URVSHGO
23	JC011URVGO
24	JC012URVMG
25	JC013URVGVGO
26	JC014URVES
27	JC015URVSHGO
28	JC016URLAGSE
29	JC017URBAHBA

() = identificação do indivíduo utilizado

Os materiais vegetais coletados dos diferentes genótipos foram armazenados separadamente em freezer a -20°C e posteriormente macerados com nitrogênio líquido, em almofariz, e armazenados para posterior extração de DNA.

2.5.3 Extração e quantificação de DNA

Tanto para construção da biblioteca enriquecida com locos microssatélites, como para a caracterização e estudo da estrutura genética populacional do pinhão-mansão com marcadores SSR e análise da diversidade genética utilizando marcadores ISSR, o procedimento para extração de DNA adotado foi o mesmo e está detalhado na Figura 7. O DNA foi extraído a partir do tecido vegetal macerado utilizando o protocolo CTAB descrito por Doyle e Doyle (1990) com modificações: (1) Em microtubo de 1,5 mL identificados para cada amostra foram adicionados 30 mg do tecido macerado; (2) foram adicionados 800 µL de tampão de extração (pré-aquecido a 65°C), os tubos foram fechados e agitados para ressuspender o tecido no tampão; (3) foram levados ao banho-maria (65°C) por 60 minutos, agitando-os manualmente a cada 10 minutos; (5) após serem retirados do banho-maria e com a mistura em temperatura ambiente foram adicionados 700 µL de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) e os tubos foram agitados por 5 minutos invertendo-os no mínimo 20 vezes até fazer uma emulsão homogênea; (6) os tubos foram centrifugados por 5 minutos a 12000 rpm; (7) o sobrenadante foi transferido para novos tubos também marcados; (8) foram adicionados 70% (v/v) do volume ($\approx$ 500 µl) de isopropanol gelado, misturado suavemente até formar um precipitado; (9) os tubos foram centrifugados durante 10 minutos a 12000 rpm; (10) suavemente foi descartado o máximo de sobrenadante invertendo os tubos sem perder o pellet; o precipitado secou a temperatura ambiente; (11) foram adicionados 500 µL de etanol 70% (v/v) para lavar o precipitado, deixando-o imerso por 5 a 10 minutos, invertendo-o suavemente; (12) os tubos foram centrifugados durante 5 minutos a 12000 rpm; (13) foi retirado o máximo do etanol sem perder o *pellet*; (14) foi adicionado 500 µL de etanol 95% (v/v) para lavar o precipitado, invertendo-o suavemente; (15) os tubos foram centrifugados durante 5 minutos a 12000 rpm; (16) foi retirado o máximo do etanol e o *pellet* secou em temperatura ambiente; (17) cada precipitado foi dissolvido em 100 µL de tampão TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM de EDTA, pH 8,0) acrescido de 1 µL RNase (10mg/mL) e deixado sobre bancada *overnight*. As amostras foram então armazenadas a -20°C.

Figura 7 – Esquema representativo das etapas de extração de DNA pelo método CTAB (Fonte: ROMANO e BRASILEIRO, 2005)

Após eletroforese a quantificação das amostras foi estimada pela intensidade de fluorescência emitida pelo SYBR[®] Safe sob luz ultravioleta (UV) em géis de agarose a 0,8% (p/v). Essa intensidade foi comparada à de padrões com pesos moleculares e concentrações específicos e conhecidos (DNA do fago λ).

2.5.4 Desenvolvimento e caracterização de marcadores microsatélites

2.5.4.1 Desenvolvimento de bibliotecas enriquecidas com locos microsatélites

Um genótipo de *J. curcas* foi escolhido ao acaso, entre os que foram coletados, para obtenção do DNA genômico total, conforme protocolo descrito no item 2.5.3, a fim de construir uma biblioteca enriquecida com locos microsatélites para a espécie *Jatropha curcas* L.

2.5.4.2 Construção de biblioteca genômica enriquecida com microsatélites

A construção da biblioteca genômica enriquecida com locos microsatélites foi feita utilizando o protocolo descrito por Billotte et al. (1999) com modificações (Figura 8), conforme os passos a seguir:

Restrição do DNA

Aproximadamente 6,0 µg de DNA genômico foram digeridos utilizando 5,0 µL enzima *RsaI* (10 U/µL), adicionando-se na reação 10,0 µL de tampão de reação (50 mM Tris-HCl, pH 7,8; 10 mM MgCl₂; 10 mM DTT; 25 µg/ml BSA) e água milliQ autoclavada até completar 100 µL. O material foi incubado a 37°C por 18 horas.

Ligação dos adaptadores

Os adaptadores *Rsa21* (5' - CTC TTG CTT ACG CGT GGA CTA - 3') e *Rsa25* (5' - TAG TCC ACG CGT AAG CAA GAG CAC A - 3') foram ligados aos fragmentos digeridos de extremidade abrupta com a enzima T4 DNA ligase (Amersham Pharmacia Biotech). Foram utilizados 2 µL do adaptador *Rsa21* (10 µM) e 2 µL do adaptador *Rsa25* (10 µM), 6,0 µL do DNA genômico digerido no passo anterior, 10,0 µL do tampão 5X (50 mM Tris-HCl, pH 7,8; 10 mM MgCl₂; 10 mM DTT; 25 µg/ml BSA), 4,0 µL de T4 DNA ligase e água milliQ autoclavada para completar 50,0 µL. Esta reação foi incubada a 20°C por 2 horas.

Pré-Amplificação via PCR

Para gerar uma maior quantidade de DNA para a seleção, os fragmentos digeridos foram submetidos a uma PCR utilizando como *primer* um dos adaptadores, o *Rsa21*. Após a ligação os fragmentos foram amplificados utilizando 5 µL do produto da ligação; 2,0 µL do *primer* *Rsa21* (10 µM); 5,0 µL de tampão 10 X (50 mM KCl; 10 mM de Tris-HCl, pH 8,9); 2,0 µL de MgCl₂ (50,0 mM); 4µL de dNTP (2,5 mM), 1,0 µL de *Taq* polimerase (5 U) e água milliQ autoclavada para completar 50,0 µL. Esta reação foi submetida a uma etapa inicial de desnaturação a 95°C por 4 minutos, seguida de 20 ciclos de 94°C por 30 segundos, 60°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto. Um passo prolongado de extensão de 72°C por 8 minutos foi adicionado após o último ciclo. Os fragmentos amplificados foram purificados utilizando o Kit Concert (Invitrogen Life Sciences).

Seleção dos fragmentos contendo SSR

O processo de enriquecimento foi realizado através da hibridização de oligonucleotídeos conjugados a biotinas, biotIII(TTC)₁₀, biotIII(CG)₁₀ e biotIII(GT)₁₀, complementares a sequências repetitivas GA, GC e AAG. Os fragmentos contendo tais repetições foram recuperados por estreptavidina ligada a microesferas magnéticas utilizando o kit Streptavidine-Magnisphere (Promega). Para realização das lavagens, as esferas magnetizadas foram atraídas por um ímã posicionado lateralmente ao tubo em um suporte.

A fração enriquecida contendo os fragmentos de DNA previamente ligados aos adaptadores foi incubada a 95°C por 15 minutos para a desnaturação da dupla fita. Ao DNA desnaturado foram adicionados 3 µL de cada oligonucleotídeo marcado com as biotinas. Esta solução de hibridização foi incubada a temperatura ambiente sob constante agitação e após 20 minutos foi adicionada às esferas magnetizadas previamente lavadas seguindo as recomendações do fabricante. A suspensão contendo as esferas magnetizadas e o complexo DNA-sonda foi incubada por 10 minutos à temperatura ambiente sob suave agitação.

Após a incubação, foram realizadas lavagens conforme descrito por BILLOTTE et al. (1999) e os fragmentos selecionados foram recuperados através de lavagem com 250 µL de água milliQ autoclavada.

Amplificação dos fragmentos selecionados via PCR

Após a seleção dos fragmentos enriquecidos, estes foram submetidos a uma PCR utilizando como *primer* o adaptador *Rsa21*. A amplificação foi realizada utilizando 20 µL do produto da ligação; 4,0 µL do primer *Rsa21* (20 µM); 10 µL de tampão 10 X (50 mM KCl; 10 mM de Tris-HCl pH 8,9); 4,0 µL de MgCl₂ (2,0 mM); 8 µL de dNTP (2,5 mM), 5U de *Taq* polimerase (Invitrogen) e água milliQ autoclavada para completar 100,0 µL. Esta reação foi submetida a uma etapa inicial de desnaturação a 95°C por 1 minuto, seguida de 25 ciclos de 94°C por 40 segundos, 60°C por 1 minuto e 72°C por 2 minutos. Um passo prolongado de extensão de 72°C por 5 minutos foi adicionado após o último ciclo.

Clonagem em vetor pGEM-T e transformação em células supercompetentes

Após a amplificação, 3 µL dos produtos da PCR foram ligados a 1 µL do vetor pGEM-T (kit Promega), segundo o protocolo fornecido com o vetor plasmidial, e foram transformados em células XL1-Blue competentes. As células transformadas foram plaqueadas em meio LB sólido contendo ampicilina (100 µg/ml), 60 µL IPTG (24 mg/ml) e 60 µL X-Gal (20 mg/ml). As placas foram incubadas invertidas a 37 °C por 18 horas em estufa para o crescimento de colônias.

Manutenção dos clones

Para garantir que cada construção (vetor + fragmento) fosse mantida em condições apropriadas para análise posterior, foram utilizadas placas ELISA com fundo em U, com 80 µL de meio LB contendo ampicilina (100µg/ml) por poço. As colônias brancas foram repicadas com a ajuda de palitos estéreis. As placas foram incubadas a 37 °C *overnight* em estufa para o

crescimento de colônias. Após esse período as placas foram armazenadas em freezer -20°C por 30 minutos e então foram armazenadas em freezer -80°C com glicerol 50% (p/v).

2.5.4.3 Seleção e sequenciamento dos clones positivos

Amplificação dos insertos clonados

Com o objetivo de identificar os clones contendo microssatélites e verificar a eficiência do procedimento de enriquecimento e clonagem, foi realizada uma reação de amplificação dos insertos diretamente das colônias obtidas na etapa anterior, utilizando o *primer Rsa21*. Colônias individuais foram transferidas com um palito estéril para o tubo de PCR contendo 30,5 µL de água milliQ estéril. Esta suspensão de células foi utilizada em uma reação com volume final de 45,0 µL contendo as seguintes concentrações dos reagentes: 5,0 µL de tampão 10X (50 mM KCl; 10mM de Tris-HCl, pH 8,9), 4,0 µL de MgCl₂ (2,5 mM), 4,0 µL de dNTP (2,5 mM), 2,5 µL de *Rsa21* (10 mM), 1,0 µL de *Taq* DNA polimerase (5 U/µL). Esta reação foi submetida a um passo inicial de desnaturação a 95°C por 4 minutos, seguido de 30 ciclos (94°C por 30segundos, 52°C por 45segundos, 72°C por 1 minuto e 30 segundos) e um passo final de extensão a 72°C por 8 minutos. Para controle, 10 µL do volume da reação foi utilizado na eletroforese em gel de agarose 1,5% (p/v).

Inoculação e extração plasmidial

Com o objetivo de isolar o DNA plasmidial das colônias recombinantes para posterior sequenciamento foi colocado 1 ml de meio Circle Grow contendo 100 µg/ml de ampicilina em cada amostra da microplaca; foram inoculadas colônias individuais com o auxílio de pipeta multicanal. A placa foi selada com adesivo, foram feitos furos em cima com uma agulha para aeração durante o crescimento, foi incubada a 37°C (shaker) a 300 rpm durante 22h; o adesivo da placa foi trocado e placa foi centrifugada por 6 minutos a 3000 rpm, para sedimentar as células; foi descartado o sobrenadante e a placa foi mantida invertida sobre papel absorvente por 1 minutos; foi adicionado a cada amostra 240 µL de solução GTE [Glicose 20%, Tris 1 M (pH 7,4), EDTA 0,5 M (pH 8,0)], a placa foi selada com adesivo e houve a ressuspensão das células agitando-as no vortex por 2 minutos; a placa foi centrifugada por 6 minutos a 4000 rpm e o sobrenadante foi descartado; foi adicionado a cada amostra 80 µL de GTE, a placa foi selada com adesivo para etanol e agitada no vortex por 5 minutos; foi transferido 60 µL de cada suspensão de

células para placa com fundo em U contendo 5 µL de RNase (10 mg/mL); foi adicionado a cada amostra 60 µL de NaOH 0,2M – SDS 1% (p/v), a placa foi selada com adesivo e a solução foi misturada 10 vezes por inversão e incubada 10 minutos à temperatura ambiente; após esse período a placa foi centrifugada brevemente; foi adicionado a cada amostra 60 µL de KOAc 3 M, a placa foi selada com adesivo e a solução foi misturada 10 vezes por inversão, centrifugada brevemente; o adesivo foi removido e a placa incubada em estufa a 90°C por exatos 30 minutos; a placa foi esfriada em gelo por 10 minutos e centrifugada por 4 minutos a 4000 rpm; foi fixada com fita adesiva uma placa filtro no topo de uma placa de fundo em U, foi transferido todo o volume para a placa filtro, e centrifugada por 4 minutos a 4000 rpm, a 20°C; foi removida a placa filtro e adicionado ao filtrado 110 µL de isopropanol; a placa foi selada com adesivo e a solução foi misturada 20 vezes por inversão e centrifugada por 45 minutos a 4000 rpm a 20°C; o sobrenadante foi cuidadosamente descartado e foram adicionados 200 µL de etanol 70% (v/v) gelado; a placa foi centrifugada por 5 minutos a 4000 rpm a 20°C, e o sobrenadante descartado; a placa foi invertida sobre papel absorvente, centrifugada invertida até 600 rpm. A placa secou por 60 minutos à temperatura ambiente e foi ressuspensa em 60 µL de água milliQ (*overnight*).

Seleção dos insertos e sequenciamento

Este método garante que somente insertos que contenham microssatélites sejam amplificados usando *primer* que se reassocia ao sítio T7 como à sequência de microssatélites presente no inserto. A utilização do *primer* T7 leva à amplificação do sítio inteiro. As reações de sequenciamento foram realizadas em um termociclador PTC-200 (MJ Research, Inc.) em um volume final de 10 µL contendo 2,0 µL de tampão Save Money (2,5 µL de MgCl₂ 2 M, 200 µL de Tris-HCl 1 M pH 9,0), 0,5 µL de *primer* T7 (5 pMol/µL), 0,4 µL de Big Dye, 3 µL de DNA (1µg) e 4,1 µL de H₂O milliQ.

Esta reação foi submetida a uma etapa inicial de desnaturação a 96°C por 2 minutos, seguida de 25 ciclos (96°C por 45 segundos, 50°C por 30 segundos, 60°C 4 minutos) e um passo final a 4°C até retirar a reação da máquina. Para eliminar possíveis interferentes ou excessos de reagentes da reação de sequenciamento e deixar as amostras prontas para a eletroforese, foi realizada a purificação das amostras. Foram adicionados nas amostras 80 µL de isopropanol 65% (v/v) e foi agitado suavemente; ficou na bancada por 15 minutos e foi centrifugado a 3000 rpm por 45 minutos; o sobrenadante foi descartado e a placa foi mantida invertida por 1 minuto em papel absorvente para secar. Foram adicionados 200 µL de etanol 60% (v/v) e centrifugado a

3000 rpm por 10 minutos; o sobrenadante foi descartado e a placa foi mantida invertida por 1 minuto em papel absorvente para secar. A lavagem foi repetida. Foi dado um *spin* com placa invertida. A placa ficou no fluxo laminar por 1 hora para secar.

Depois de feita a extração e purificação, a sequência de cada clone selecionado foi determinada através da análise em um sequenciador automático modelo 3100 (*Applied Biosystem*).

Análises das sequências

Os cromatogramas produzidos pelo sequenciador foram analisados através do programa Chromas 2.21 (Technelysium Pty Ltd). As sequências foram obtidas através do 3730/3730xl *Data Collection Software v3.0* (*Applied Biosystems*), foram processadas com o auxílio do conjunto de *softwares Phred, Consed e Cross_Match* (*Laboratory of Phil Green, Genome Sciences Department, University of Washington* – <http://www.phrap.org/index.html>). Por meio de ferramentas disponíveis nestes programas foram retiradas das sequências as regiões correspondentes ao vetor e ao adaptador, restando apenas a sequência do inserto. Trechos de má qualidade e sequências cujas bases não puderam ser identificadas com segurança (parâmetro *Phred* > 20), também foram excluídos. Com isso, arquivos do tipo “FASTA” foram obtidos, contendo apenas sequências de interesse e com boa qualidade. Estas sequências “FASTA” foram então processadas pelo *software CAP3 Sequence Assembly Program* (HUANG e MADAN, 1999), para identificar “contigs” e “singlets”. Para construção dos “contigs” foi necessária uma sobreposição de no mínimo 20 pares de base entre duas sequências, assim os “contigs” e “singlets” puderam ser analisados pelo programa WebSat (MARTINS et al., 2010).

Foram adotados parâmetros para identificação das regiões de interesse, tais como: microssatélites mononucleotídeos deveriam ter no mínimo dez repetições do motivo, dinucleotídeos deveriam ter no mínimo cinco repetições do motivo, microssatélites constituídos por trinucleotídeos deveriam ter no mínimo quatro repetições do motivo, microssatélites constituídos por tetranucleotídeos deveriam ter no mínimo três repetições do motivo e pentanucleotídeos deveriam ter no mínimo duas repetições do motivo. Em virtude destes parâmetros, algumas sequências foram excluídas da análise, restando apenas sequências que continham microssatélites com características desejáveis. A partir daí, os pares de *primers* complementares às sequências que flanqueiam as ilhas de repetição microssatélites, foram desenhados utilizando o programa WebSat (<http://wsmartins.net/websat/>). Para tanto, foram

utilizados os critérios estabelecidos por Rafalski et al. (1996): (1) as seqüências flanqueadas não devem ultrapassar 22pb para reduzir os custos de síntese; (2) a temperatura de pareamento (T_m) deve ser acima de 46°C; (3) a concentração de sal deve ser cerca de 50mM, para assegurar a amplificação específica e abrangente; (4) porcentagem de GC entre 40% a 60%; (5) ausência de formação de estruturas secundárias; (6) produtos de PCR entre 100 e 360pb a fim de atender as metodologias padrão em estudos envolvendo microssatélites. Para evitar o desenho de pares de *primers* redundantes todas as seqüências obtidas foram alinhadas entre si. O alinhamento foi realizado com auxílio do programa de alinhamento múltiplo Clustal X (THOMPSON et al., 1999). Visando facilitar a detecção de polimorfismo, os *primers* foram desenhados, sempre que possível, de forma que o produto de amplificação tenha no mínimo 100 e no máximo 250 pb.

Figura 8 – Esquema representativo das etapas da construção da biblioteca enriquecida com locos microssatélites

Amplificações iniciais, visualização dos produtos de PCR e interpretação do gel

Para cada par de *primers* desenhados, foram realizadas séries de amplificações visando alcançar as melhores condições para amplificação dos locos. Para as amplificações foi utilizada a

enzima *Taq* DNA polimerase (Invitrogen). As amplificações foram padronizadas para cada loco, variando a temperatura de reassociação e as concentrações de $MgCl_2$, DNA molde, dNTP e enzima. Os *primers* microsatélites obtidos no desenvolvimento desse estudo foram sintetizados por *Gene Link, Inc.*

2.5.4.4 Avaliação do polimorfismo dos locos microsatélites

A avaliação de polimorfismo foi feita com quatro indivíduos de cada população objetivando-se pelo menos dez locos microsatélites polimórficos para a espécie estudada. Estes locos selecionados foram utilizados para a genotipagem das 12 populações (15 indivíduos de cada população totalizando 180 indivíduos) de pinhão-mansão, visando o estudo populacional.

2.5.4.5 Condições de amplificação dos locos microsatélites

Para este trabalho foram testados 18 pares de *primers* desenvolvidos para a espécie neste estudo, com o desenvolvimento da biblioteca enriquecida com locos microsatélite e 30 pares de *primers* desenvolvidos no Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG) da Unicamp. Reações de PCR foram realizadas para os locos microsatélites, desenvolvidos neste estudo e desenvolvidos no CBMEG. A reação para os 18 locos desenvolvidos neste trabalho foram preparadas em um volume final de 25 μ L contendo cerca de 25 η g do DNA; 0,4 μ M do *primer* direto e 0,4 μ M do *primer* reverso ; 250 μ M de cada desoxirribonucleosídeo trifosfato (dNTP); solução tampão de Buffer 1 X (50 mM de KCl; 10 mM de Tris-HCl, pH 8,9); 3mM $MgCl_2$ e 1 U de *Taq* DNA polimerase. Para estes locos estudados, o ciclo total das amplificações foi realizado em um termociclador MyCycler (Bio-Rad Laboratories Inc.) com o programa denominado Touchdown (DON et al., 1991), iniciando com cinco minutos a 95° C para uma desnaturação inicial, seguido por sete ciclos com 30 segundos de desnaturação a 94° C, 40 segundos de pareamento iniciando com temperatura de 67° C (diminuindo dois graus a cada ciclo) e um minuto de extensão a 72°C, mais 24 ciclos com 30 segundos de desnaturação a 94° C, 40 segundos de pareamento a 53° C e um minuto de extensão a 72° C, finalizando com 10 minutos a 60° C extensão final.

Dos 30 pares de *primers* desenvolvidos no CBMEG, 23 foram submetidos a uma reação de PCR realizada em um volume final de 25 μ L nas mesmas condições citadas no parágrafo anterior, diferindo apenas na concentração dos *primers* que foi de 0,2 μ M tanto para o direito quanto para o reverso. Para os sete outros locos a reação de PCR também foi realizada nas condições citadas no parágrafo anterior diferindo na concentração dos *primers* que foi de 0,2 μ M tanto para o direito quanto para o reverso e na concentração do $MgCl_2$ que neste caso foi de 4 mM. Para os 30 locos o ciclo total das amplificações também foi realizado em um termociclador MyCycler (Bio-Rad Laboratories Inc.) nas mesmas condições citadas no parágrafo anterior.

Os produtos de amplificação foram separados sob condições desnaturantes em gel 7% de poliacrilamida (v/v), contendo 5,6 M de uréia, em TBE 1X (0,045 M Tris-borato e 0,001 M EDTA), em tensão constante de 70W e corados com nitrato de prata a 0,2 %, conforme protocolo descrito por Creste et al. (2001) com modificações, detalhado a seguir: (1) solução fixadora I: 10% etanol; 1% ácido acético por 10 minutos, seguida de uma lavagem em água deionizada por um minuto; (2) solução fixadora II: 1,5% ácido nítrico por três minutos, seguida de uma lavagem em água deionizada por um minuto; (3) solução de impregnação: 0,2% solução de nitrato de prata ($AgNO_3$) por 20 minutos, seguida de uma lavagem em água deionizada por um minuto; (4) solução reveladora: 30g/litro de carbonato de cálcio (Na_2CO_3), 540 μ l de formaldeído/litro, por quatro a sete minutos; (5) solução bloqueadora: 5% ácido acético por três minutos, seguida de uma lavagem em água deionizada por um minuto. O tamanho dos fragmentos amplificados foi estimado por comparação com marcador molecular de 10 pb DNA *Ladder*.

2.5.4.6 Metodologia de análise estatística dos dados com marcador codominante

Não foram realizadas análises estatísticas dos dados com marcadores microsatélites em razão da ausência de locos polimórficos entre as populações do banco de germoplasma do CPQBA, e insuficiência de locos polimórficos nos grupos formados pelos acessos dos bancos de germoplasma do CPQBA e da UFS.

2.5.5 Teste e seleção de *primers* ISSR

Para este estudo, também, foram testados 42 *primers* ISSR descritos na literatura. Os testes foram realizados utilizando dois indivíduos escolhidos aleatoriamente dos grupos, visando definir as melhores condições de amplificação, como temperatura de reassociação. A partir dos padrões de amplificação obtidos foram selecionados *primers* que apresentaram os melhores padrões de bandas, que foram utilizados nas análises. As reações de PCR foram realizadas para os *primers* ISSR em um volume final de 20 µL contendo cerca de 10 ng do DNA; 0,25 µM do *primer*; 250 µM de cada desoxirribonucleosídeo trifosfato (dNTP); solução tampão de Buffer 1 X (50 mM de KCl; 10 mM de Tris-HCl, pH 8,9); 1,5 mM de MgCl₂; 5 µg de BSA e 1 U de *Taq* DNA polimerase. Para estes *primers* estudados, o ciclo total das amplificações foi realizado em um termociclador MyCycler (Bio-Rad Laboratories Inc.) programado para iniciar com um minuto e 30 segundos a 94° C para uma desnaturação inicial, seguido por 35 ciclos com 45 segundos de desnaturação a 94° C, 45 segundos de pareamento (ver temperatura para cada *primer* na Tabela 15) e um minuto e 30 segundos de extensão a 72° C, finalizando com cinco minutos a 72° C para extensão final. Os produtos da amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose 2% em tampão TBE 0,5X (90 mM Tris-Base, 90 mM ácido bórico e 2 mM EDTA) com tensão constante de 90 V. Os fragmentos foram visualizados pela fluorescência emitida pelo Azul de Bromofenol e Blue Green sob luz UV e fotografados. Os tamanhos dos fragmentos amplificados foram estimados por comparação com marcador molecular de 100 pb DNA *Ladder*.

2.5.5.1 Metodologia de análise estatística dos dados com marcador dominante

A partir das imagens obtidas foi realizada a leitura dos géis, genotipando os indivíduos quanto à presença (1) ou ausência (0) de fragmentos, gerando uma matriz binária. Esta matriz permite o cálculo da porcentagem de polimorfismo obtido com cada *primer* utilizado a partir da seguinte fórmula:

$$P = \frac{nbp}{nbt}$$

Onde:

P = porcentagem de polimorfismo (ou taxa de polimorfismo);

nbp = número de bandas polimórficas;

nbt = número de bandas total.

Com esta matriz de dados calculou-se o coeficiente de similaridade de Jaccard entre todos os indivíduos conforme a expressão abaixo:

$$S_{ij} = \frac{a}{a + b + c}$$

Onde:

a = número de casos em que ocorre a presença da banda em ambos os indivíduos, simultaneamente;

b = número de casos em que ocorre a presença da banda somente no indivíduo i ;

c = número de casos em que ocorre a presença da banda somente no indivíduo j .

As similaridades genéticas entre os acessos dos grupos foram visualizadas através de dendrograma construído pela matriz de identidade genética de Nei (1978) e pelo critério de agrupamento UPGMA, e para isto utilizou-se o programa NTSYS (ROHLF, 2000). O valor cofenético foi calculado, com o mesmo programa, através de um teste de Mantel com 1.000 permutações com o objetivo de estimar quanto da matriz original foi explicada pelo dendrograma obtido. A análise *bootstrap* de cada agrupamento foi determinada por meio do aplicativo BOOD (COELHO, 2000).

A análise da variância molecular (AMOVA) foi realizada através da decomposição total nas suas componentes entre e dentro dos grupos utilizando-se as distâncias ao quadrado, conforme descrito por Excoffier et al. (1992) com o auxílio do programa ARLEQUIM (SCHNEIDER et al., 2000). As distâncias genéticas foram obtidas conforme Nei e Li (1979), a significância destas estimativas foi obtida pelo método de randomização utilizando 1.000 *bootstrap*:

$$D = \{\delta_{xy}^2\} = 100 \left[1 - \frac{2n_{xy}}{n_x + n_y} \right]$$

Em que:

n_x e n_y = números de marcadores observados em indivíduos x e y;

$2n_{xy}$ é o número de marcas existentes em ambos os indivíduos.

A análise da diversidade genética entre e dentro dos grupos foi realizada utilizando o programa POPGENE VERSION 1.32 (YEH et al., 2000). Foi feita a análise de variância (ANOVA) *F-teste*, a 95% de probabilidade, complementado com exame *a priori t Boferroni* (RICE, 1989), para a comparação dos índices obtidos entre os grupos. Foram estimados:

- número de alelos observados (n_a);
- número efetivo de alelos (n_e) (KIMURA e CROW, 1964);
- porcentagem de locos polimórficos;
- índice de Shannon (LEWONTIN, 1972).

O programa STRUCTURE 2.3 (PRITCHARD et al., 2000) foi utilizado visando definir o número de grupos (K) mais provável nas amostras, através de métodos bayesianos, não necessitando de informações hierárquicas *a priori* para definir os grupos de indivíduos geneticamente relacionados com o objetivo de visualizar a estrutura genética dos acessos dos bancos germoplasma. A determinação do número K mais provável em relação aos propostos foi realizada utilizando valores de ΔK , segundo Evanno et al. (2005).

2.5.6 Resultados

2.5.6.1 Caracterização da estrutura genética populacional da espécie *Jatropha curcas*

2.5.6.1.1 Desenvolvimento de bibliotecas enriquecidas com locos microssatélites

A extração do DNA genômico a partir de 500 mg do material vegetal de um genótipo de pinhão-mansão forneceu uma concentração de aproximadamente 300 ng/ μ L e foram utilizados seis ng na reação. Na digestão com a enzima *RsaI* o DNA genômico foi digerido não gerando nenhum tamanho preferencial de fragmento e produzindo o perfil adequado para a construção da biblioteca. A ligação dos adaptadores foi importante para garantir que cada fragmento tivesse uma terminação comum e conhecida. A pré-amplificação foi realizada com sucesso, confirmando a ligação dos adaptadores aos fragmentos e gerando uma maior quantidade de DNA para a

seleção. Não houve a amplificação aparente de fragmentos preferenciais, o que poderia ser prejudicial nas próximas etapas, levando a clonagem e sequenciamento de fragmentos preferenciais, aumentando o tempo e os custos para a identificação de microssatélites não redundantes.

A eficácia do enriquecimento foi verificada através dos produtos de PCR obtidos diretamente de colônias individuais e foi confirmada com a técnica de sequenciamento. Cerca de 67% dos clones analisados apresentaram presença de regiões microssatélites, sendo que algumas das sequências apresentavam mais de uma região microssatélite.

2.5.6.1.2 Análise das sequências, desenvolvimento e utilização dos *primers* microssatélites

Através de uma interface web, o programa WebSat localizou, nos 89 insertos sequenciados, 60 que possuíam pelo menos um microssatélite. Nestas 89 sequências foram encontradas um total de 64 motivos microssatélites, sendo 23 motivos dinucleotídeos, 38 motivos trinucleotídeos e três motivos tetranucleotídeos (Figura 9). Foram usados critérios estabelecidos pelo programa para localizar as regiões repetitivas do DNA.

Figura 9 – Porcentagem de motivos microssatélites encontrados nos 89 insertos sequenciados que apresentaram pelo menos uma região microssatélite

Todas as sequências obtidas foram alinhadas entre si e as que apresentaram redundância foram excluídas. Dezoito destas sequências puderam ser utilizadas para o desenho de *primers* complementares às regiões flanqueadoras dos microssatélites, considerando a não formação de estruturas secundárias. As sequências restantes não foram utilizadas, pois a região flanqueadora

era também um microsatélite ou estava muito próximo de uma das extremidades da sequência impossibilitando o desenho dos *primers*. Dentre as 18 pares de sequências escolhidas para o desenho de *primers* estão presentes diferentes motivos (Tabela 9).

Tabela 9 – *Primers* desenhados a partir das sequências microsatélites desenvolvidas neste estudo

(Continua)

Nome		<i>Primer forward / reverse (5' → 3')</i>	Tm	Produto (pb)	Motivo	Classificação
Jcur 1	F	TCCAAGCCAAATCTGATGAT	56	241	(GT) ₉	Dinucleotídeo Perfeito
	R	TGATCGACTGACTGGGAAGA	60			
Jcur 2	F	GCTCAATCCTAGCCATCCAA	60	241	(TCT) ₁₄	Trinucleotídeo Perfeito
	R	CTCTTGCTTACGCGTGGACT	62			
Jcur 3	F	AATCAAGTTGGATGGGTGAA	56	184	(GAA) ₇	Trinucleotídeo Perfeito
	R	GACCAAAATACCCCTTAGTTGC	64			
Jcur 4	F	GACCAAAATACCCCTTAGTTGC	64	206	(CTT) ₁₁	Trinucleotídeo Perfeito
	R	CGCGTGGGACTACTTAAATC	60			
Jcur 5	F	CGTCTCCTTAGCCTCTGCTC	64	157	(CT) ₁₈	Dinucleotídeo Perfeito
	R	CGCGTGGGACTACTTAAATC	62			
Jcur 6	F	GGAGGTAATAAAGCATGAAGCA	62	204	(CA) ₈	Dinucleotídeo Perfeito
	R	GAAAGGGAGTGATGTGTTGCT	63			
Jcur 7	F	GCTCAAACCCTCTCAAGTTGT	62	194	(TTG) ₄ (TTC) ₇	Trinucleotídeo Composto
	R	CGCGTGGACTAACTACTGGT	58			
Jcur 8	F	TGACAAAAGCGACAGTTCGT	58	168	(TC) ₁₇	Dinucleotídeo Perfeito
	R	CCCACTTCAAAACCCAAGAA	60			
Jcur 9	F	GGGGGACACATTAGACTTCCT	64	246	(TC) ₁₃	Dinucleotídeo Perfeito
	R	GCGTGGACTAACACAAGCAT	62			
Jcur 10	F	CTAGTGATTCCACAATGCAGTC	64	235	(GA) ₁₆	Dinucleotídeo Perfeito
	R	CAGGACATACGGGGACTGTT	62			
Jcur 11	F	CGAATTCACCCCGTGATTACT	62	246	(GAA) ₁₁ (AGG) ₄	Trinucleotídeo Composto
	R	GGGACCAAGTAGATGGGAGA	58			
Jcur 12	F	CACCACAAATCACTTCTCAAGC	64	200	(AGA) ₄ (AAG) ₁₁	Trinucleotídeo Composto
	R	AAGACCAAAACACCCTCCAA	54			
Jcur 13	F	CCATGTGAACTGTCCTTTCC	62	207	(AG) ₁₉	Dinucleotídeo Perfeito
	R	CAACTCCAATAATTGAGCATCAC	62			
Jcur 14	F	GCCTAATTTCTTCGGATTGG	58	160	(TG) ₁₀	Dinucleotídeo Perfeito
	R	GCCATTGCTAAAGGTTCTTG	58			

Tabela 9 – *Primers* desenhados a partir das seqüências microssatélites desenvolvidas neste estudo

						(Conclusão)
Nome		Primer foward / reverse (5' → 3')	Tm	Produto (pb)	Motivo	Classificação
Jcur 15	F	CCTTCTTCTTATGCCTTACACG	64	225	(TCC) ₅ (CCT) ₄ (CTT) ₁₁	Trinucleotídeo
	R	CGAATGGGACCAGACGTA	56			Composto
Jcur 16	F	CCAAAATACCCCTAGTTGCTTT	62	177	(CTC) ₄ (TTC) ₇	Trinucleotídeo
	R	TCAAGTTGGGATGGGTGAA	56			Composto
Jcur 17	F	CCATCTCTGCGTCACTCGT	60	222	(TTC) ₉	Trinucleotídeo
	R	TCTTGCTTACGCGTGGACTA	60			Perfeito
Jcur 18	F	TCCAAAAGATTGTCCCAGTTG	60	249	(TC) ₈ (CA) ₁₆ (AT) ₅	Dinucleotídeo
	R	TTTTCCCAGTCACGACGTT	56			Composto

Tm = temperatura de reassociação em °C ; pb = pares de bases

Na Figura 10 tem-se entre os *primers* desenhados qual a porcentagem de motivos microssatélites perfeitos e compostos. Na Figura 11 observa-se a distribuição, nos 18 pares de *primers* desenhados, dos motivos microssatélites perfeitos, classificados em dinucleotídeos e trinucleotídeos. Para a genotipagem das populações os 18 pares de *primers* desenvolvidos neste estudo foram sintetizados e testados (Tabela 9). Foram identificados pela seleção 12 pares de *primers* que foram utilizados visando à caracterização genética e estudo da estrutura genética populacional. Dos 18 pares de *primers* 12 amplificaram satisfatoriamente e todos se mostraram monomórficos entre e dentro das populações (Tabela10).

Figura 10 – Frequência de motivos microssatélites perfeitos e compostos

Figura 11 – Motivos microssatélites perfeitos e as frequências de motivos dinucleotídeos e trinucleotídeos

Tabela 10 – Locos SSR, desenvolvidos e testados neste estudo, todos monomórficos

(Continua)

Nome		<i>Primer foward / reverse (5' → 3')</i>	Tm	Produto (pb)	Motivo	Classificação
Jcur 1	F	TCCAAGCCAAATCTGATGAT	TD	241	(GT) ₉	Monomórfico
	R	TGATCGACTGACTGGGAAGA				
Jcur 3	F	AATCAAGTTGGATGGGTGAA	TD	184	(GAA) ₇	Monomórfico
	R	GACCAAAATACCCCTTAGTTGC				
Jcur 4	F	GACCAAAATACCCCTTAGTTGC	TD	206	(CTT) ₁₁	Monomórfico
	R	CGCGTGGGACTACTTAAATC				
Jcur 5	F	CGTCTCCTTAGCCTCTGCTC	TD	157	(CT) ₁₈	Monomórfico
	R	CGCGTGGGACTACTTAAATC				
Jcur 6	F	GGAGGTAATAAAGCATGAAGCA	TD	204	(CA) ₈	Monomórfico
	R	GAAAGGGAGTGATGTGTTGCT				
Jcur 7	F	GCTCAAACCCTCTCAAGTTGT	TD	194	(TTG) ₄ (TTC) ₇	Monomórfico
	R	CGCGTGGACTAACTACTGGT				
Jcur 9	F	GGGGGACACATTAGACTTCCT	TD	246	(TC) ₁₃	Monomórfico
	R	GCGTGGACTAACACAAGCAT				
Jcur 10	F	CTAGTGATTCCACAATGCAGTC	TD	235	(GA) ₁₆	Monomórfico
	R	CAGGACATACGGGGACTGTT				
Jcur 12	F	CACCACAAATCACTTCTCAAGC	TD	200	(AGA) ₄ (AAG) ₁₁	Monomórfico
	R	AAGACCAAAACACCCTCCAA				
Jcur 13	F	CCATGTGAAACTGTCTTTCC	TD	207	(AG) ₁₉	Monomórfico
	R	CAACTCCAATAATTGAGCATCAC				

Tabela 10 – Locos SSR, desenvolvidos e testados neste estudo, todos monomórficos

(Conclusão)

Nome		Primer foward / reverse (5' → 3')	Tm	Produto (pb)	Motivo	Classificação
Jcur 14	F	GCCTAATTTCTTCGGATTGG	TD	160	(TG) ₁₀	Monomórfico
	R	GCCATTGCTAAAGGTTCTTG				
Jcur 15	F	CCTTCTTCTTATGCCTTACACG	TD	225	(TCC) ₅ (CCT) ₄ (CTT) ₁₁	Monomórfico
	R	CGAATGGGACCAGACGTA				

Tm = temperatura de reassociação em °C; pb = pares de bases; TD = touchdown

Para a genotipagem das 12 populações os 30 pares de *primers* desenvolvidos no CBMEG foram sintetizados e testados (Tabela 11). Destes, 15 pares de *primers* amplificaram satisfatoriamente (Tabela 12) e todos se mostraram monomórficos (Figura 14) entre e dentro das populações.

Tabela 11 – *Primers* desenhados a partir das sequências microssatélites desenvolvidas no CBMEG

(Continua)

Nome		Primer foward / reverse (5' → 3')	Tm	Produto (pb)	Motivo	Classificação
Jc1-A2	F	GGATTCTTCACTCTTCATTCT	46,3	231	(TC) ₇	Dinucleotídeo Perfeito
	R	TACTTCCTATCTTTGGCTTCAC	47,6			
Jc1-A8	F	TATCCTTAAATTCAGCCCTCTC	49,2	186	(CT) ₂₀	Dinucleotídeo Perfeito
	R	AGCACTAGCAAAAACGACGAC	51,5			
Jc1-A10	F	CGTTCTTCATCTGCAGGTTT	58,0	185	(GT) ₅	Dinucleotídeo Perfeito
	R	CCATTCCACAACGTGTGCATTA	58,4			
Jc1-B4	F	CAACCCAAACAGAAACCAAAAC	51,3	285	(AG) ₁₃	Dinucleotídeo Perfeito
	R	TCTCTACCCAAACTCCCAACTT	51,4			
Jc1-B5	F	CTTAGCCATTGCCTTTTGG	59,7	141	(AG) ₁₁	Dinucleotídeo Perfeito
	R	GCTCTCTTTCACGTGCCTCT	58,8			
Jc1-B6	F	CATGGAAAACCTGAAGAATC	46,1	223	(CA) ₈	Dinucleotídeo Perfeito
	R	GAATGAAAGGCAACTGAAAA	47,1			
Jc1-B8	F	AAGGGCTGTAGTTTGGTTG	48,7	171	(GA) ₁₅	Dinucleotídeo Perfeito
	R	ACTCCTCTTCCTCCTTCACTC	48,2			
Jc1-B10-B11	F	CACTTCTAAAATCTCTCGGTTT	55,0	118	(CT) ₉	Dinucleotídeo Perfeito
	R	TTCAAATCTCATCCTCTCAAGG	58,4			
Jc1-C12	F	AAAGGGGATCTGGAGGGAAGTA	54,7	259	(GA) ₁₁	Dinucleotídeo Perfeito
	R	GCATAGTGGGAAGTGGGAACC	54,8			
Jc1-C2	F	GGTCAGTTCGGTCGGTTTCA	56,3	249	(AC) ₂₃	Dinucleotídeo Perfeito
	R	TGTGGCTTAGGATGGGATGTTG	56,2			
Jc1-D5	F	TGTATTAGGGGTGTGTGTGG	56,7	118	(GT) ₃ TT(GT) ₄	Dinucleotídeo Comp./inter.
	R	TCGAAAATTGGCTTCTGGAT	59,9			
Jc1-D8	F	TCAAAAGGAGACATGGGGATA	59,4	250	(AC) ₉ (AT) ₄	Dinucleotídeo Composto
	R	AGCTTGGTGGTTCTCACTGC	60,5			

Tabela 11 – *Primers* desenhados a partir das sequências microssatélites desenvolvidas no CBMEG

(Conclusão)

Nome		Primer foward / reverse (5' → 3')	Tm	Produto (pb)	Motivo	Classificação
Jc1-D12	F	CTTTCTCCGCGTCTCCTTAG	51,1	157	(CT) ₁₉	Dinucleotídeo Perfeito
	R	TGATGTGTGTGCTCTTGGTCTTA	50,0			
Jc1-E3	F	TCTGTCTGTCTGTCTGTGTGT	49,5	237	(GTTT) ₃	Tetranucleotídeo Perfeito
	R	AACCGCTCTTTTCCTCAA	47,1			
Jc1-E3a	F	AGGTCTCATTCCACACAGCA	59,3	171	(CAGA) ₄	Dinucleotídeo Perfeito
	R	TGTCATGGGCAAGTTAAAGG	58,6			
Jc1-E9	F	GAGGCATAGCCCTTCCAGTA	59,3	245	(CA) ₅	Dinucleotídeo Perfeito
	R	GCAGAATTAGGGTTTCAAAGAG	57,2			
Jc1-E12	F	ACAAACCAACGCCATCAAC	50,5	197	(AG) ₈ (GA) ₅	Dinucleotídeo Composto
	R	CAAATCCTCCCCCAGTAATAA	50,3			
Jc1-F2	F	ACTTTCGACTGTGTTTTCT	45,4	216	(CT) ₇	Dinucleotídeo Perfeito
	R	TGCTTCTCCAGTTTCTTCA	45,3			
Jc1-F4	F	TAATGCTGAGAAGGTTGAGACT	47,8	193	(CT) ₁₆	Dinucleotídeo Perfeito
	R	TGAGCGAATTATACTTAGCACA	47,7			
Jc1-F5	F	GGCGCTATCCATCGTGAGT	52,4	276	(CA) ₉ (AT) ₈	Dinucleotídeo Composto
	R	CCAAAGGCATAGAAGGCATAAT	52,1			
Jc1-F6	F	CTCCCCCTCCCCCTTCATA	55,0	259	(CT) ₁₀ (CT) ₁₈	Dinucleotídeo Composto
	R	CTCGCCATTCTCCCATTTG	55,1			
Jc1-G3	F	CATATTCCTTCCCATTTCACC	54,0	184	(CG) ₆	Dinucleotídeo Perfeito
	R	TATTCTTTGCCACCCAGAGAT	54,3			
Jc1-G10	F	TGGGTTCTTGAAAAGCACAG	58,9	214	(GA) ₁₄	Dinucleotídeo Perfeito
	R	TCTTTGCGATGCTGAAGTTG	60,1			
Jc1-H4	F	TCCGCTAGCAGAATGGTCA	51,4	279	(AG) ₁₀	Dinucleotídeo Perfeito
	R	ATGGAAGAGGTGGCTACAAAAT	51,5			
Jc1-H6	F	AAAGAAGGGGTAAAAGATAACA	46,7	198	(AC) ₇	Dinucleotídeo Perfeito
	R	TAGGTGAATGGATGAGGTAAC	47,4			
Pinhão D1-1	F	TCACAAAAAGGATTTCGTAAAAAGAT	60,0	240	(GAG) ₄	Trinucleotídeo Perfeito
	R	CAGAAAGACAGGCAAGGAAAAA	60,0			
Pinhão D3-1	F	AGCCGTGCAAGAAATATGG	60,0	165	(AAG) ₃ T(CA) ₃	Tri/dinucleotídeo Comp./inter.
	R	GCGTGCTTCTTGTTTTCTC	60,0			
Pinhão E7-1	F	AGCGAGAATAGGAGCAGCAGA	60,0	230	(TA) ₅	Dinucleotídeo Perfeito
	R	CTCGGCATCAAAAAGGGTATC	60,0			
Pinhão G5-1	F	TCCGAGGACATCACTGAGGTAAAG	60,0	260	(GAG) ₄	Trinucleotídeo Perfeito
	R	AAAACAAAGGGAAAGCTGGTAAAA	60,0			
Pinhão SP6 G9. 19-1	F	GCTAGCGGCAGGGAAATGA	60,0	275	(TAA) ₄	Trinucleotídeo Perfeito
	R	GCGGGCTTGCTCGTTAGG	60,0			

Tm = temperatura de reassociação em °C; pb = pares de bases

Na Figura 12 observa-se entre os *primers* desenhados qual a porcentagem de motivos microssatélites perfeitos, compostos e compostos interrompidos, e na Figura 13 observa-se a distribuição entre os motivos microssatélites perfeitos, os motivos classificados em dinucleotídeos, trinucleotídeo e tetranucleotídeo.

Figura 12 – Frequência de motivos microssatélites perfeitos, compostos e compostos interrompidos

Figura 13 – Motivos microssatélites perfeitos e as frequências de motivos dinucleotídeos, trinucleotídeos e tetranucleotídeos

Tabela 12 – Locos SSR, desenvolvidos no CBMEG da Unicamp, monomórficos

Nome		Primer foward / reverse (5' → 3')	Tm	Produto (pb)	Motivo	Classificação
Jc1-A8	F	TATCCTTAAATTCAGCCCTCTC	TD	186	(CT) ₂₀	Monomórfico
	R	AGCACTAGCAAAAACGACGAC				
Jc1-A10	F	CGTTCTTCATCTGCAGGTTT	TD	185	(GT) ₅	Monomórfico
	R	CCATTCCACAACCTGTGTCATTA				
Jc1-B4	F	CAACCCAACAGAAACCAAAAC	TD	285	(AG) ₁₃	Monomórfico
	R	TCTCTACCCAACTCCCAACTT				
Jc1-B5	F	CTTAGCCATTGCCTTTTTGG	TD	141	(AG) ₁₁	Monomórfico
	R	GCTCTCTTTCAGTGTGCCTCT				
Jc1-B6	F	CATGGAAAACCTGAAGAATC	TD	223	(CA) ₈	Monomórfico
	R	GAATGAAAGGCAACTGAAAA				
Jc1-B8	F	AAGGGCTGTAGTTTTGGTTG	TD	171	(GA) ₁₅	Monomórfico
	R	ACTCCTCTTCCTCCTTCACTC				
Jc1-B10-B11	F	CACTTCTAAAATCTCTCGGTTT	TD	118	(CT) ₉	Monomórfico
	R	TTCAAATCTCATCTCTCAAGG				
Jc1-C12	F	AAAGGGGATCTGGAGGGAAGTA	TD	259	(GA) ₁₁	Monomórfico
	R	GCATAGTGGGAAGTGGGAACC				
Jc1-C2	F	GGTCAGTTCGGTCGGTTTTCA	TD	249	(AC) ₂₃	Monomórfico
	R	TGTGGCTTAGGATGGGATGTTG				
Jc1-D8	F	TCAAAAGGAGACATGGGGATA	TD	250	(AC) ₉ (AT) ₄	Monomórfico
	R	AGCTTGGTGGTTCTCACTGC				
Jc1-D12	F	CTTTCTCCGCGTCTCCTTAG	TD	157	(CT) ₁₉	Monomórfico
	R	TGATGTGTTGCTCTTGGTCTTA				
Jc1-E9	F	GAGGCATAGCCCTTCCAGTA	TD	245	(CA) ₅	Monomórfico
	R	GCAGAATTAGGGTTTCAAAGAG				
Jc1-H6	F	AAAGAAGGGGTAAAAGATAACA	TD	198	(AC) ₇	Monomórfico
	R	TAGGTGAATGGATGAGGTAAC				
Pinhão D3-1	F	AGCCGTGCAAAGAAATATGG	TD	165	(AAG) ₃ T(CA) ₃	Monomórfico
	R	GCGTGCTTCTTGTTCCTC				
Pinhão E7-1	F	AGCGAGAATAGGAGCAGCAGA	TD	230	(TA) ₅	Monomórfico
	R	CTCGGCATCAAAAAGGGTATC				

Tm = temperatura de reassociação em °C; pb = pares de bases; TD = touchdown

2.5.6.1.3 Avaliação do polimorfismo dos locos microssatélites

Em razão da ausência de polimorfismo entre e dentro das populações estudadas, do banco de germoplasma do CPQBA, não foi possível realizar a caracterização da estrutura genética populacional da espécie. Sendo assim, o enfoque deste trabalho foi direcionado para a caracterização genética de acessos de pinhão-manso de dois bancos de germoplasma. Para tanto, amostrou-se um indivíduo de cada população do referido banco, formando um grupo com 12 acessos (considerando que os indivíduos dentro de cada população se comportaram como sendo

um só) e, 17 indivíduos provenientes do banco ativo de germoplasma da Universidade Federal de Sergipe (UFS) representando outro grupo. A diversidade genética entre estes dois grupos foi avaliada utilizando marcadores SSR (codominantes) e marcadores ISSR (dominantes).

Figura 14 – Gel de poliacrilamida mostrando perfil monomórfico, entre e dentro das populações, de um dos pares de *primers* microssatélites analisados (*primer* Jc1-B5) e comparado com marcador molecular padrão de 10 pb DNA Ladder

2.5.6.2 Diversidade genética entre acessos de pinhão-mansão de bancos de germoplasma

2.5.6.2.1 Avaliação do polimorfismo dos locos microssatélites

Para avaliação do polimorfismo dos locos SSRs entre os 29 acessos (Tabela 8) dos dois bancos de germoplasma aqui estudados foram utilizados os mesmos locos microssatélites, nas mesmas condições do estudo das populações, ou seja, os 18 pares de *primers* desenvolvidos para este trabalho (Tabela 9) e os 30 pares de *primers* desenvolvidos no CBMEG (Tabela 11). Estes 48 pares de *primers* foram testados nos 29 acessos pinhão-mansão, 39 locos amplificaram satisfatoriamente, sendo que 35 se mostraram monomórficos (Figura 15) e apenas quatro se mostraram polimórficos (Figura 16), como pode ser observado nas Tabelas 13 e 14.

Tabela 13 – Locos microssatélites desenvolvidos neste trabalho e utilizados na caracterização dos acessos de pinhão-manso

Nome		Primer foward / reverse (5' → 3')	Tm	Produto (pb)	Motivo	Classificação
Jcur 1	F	TCCAAGCCAAATCTGATGAT	TD	241	(GT) ₉	Monomórfico
	R	TGATCGACTGACTGGGAAGA				
Jcur 3	F	AATCAAGTTGGATGGGTGAA	TD	184	(GAA) ₇	Monomórfico
	R	GACCAAAATACCCCTTAGTTGC				
Jcur 4	F	GACCAAAATACCCCTTAGTTGC	TD	206	(CTT) ₁₁	Monomórfico
	R	CGCGTGGGACTACTTAAATC				
Jcur 5	F	CGTCTCCTTAGCCTCTGCTC	TD	157	(CT) ₁₈	Monomórfico
	R	CGCGTGGGACTACTTAAATC				
Jcur 6	F	GGAGGTAATAAAGCATGAAGCA	TD	204	(CA) ₈	Monomórfico
	R	GAAAGGGAGTGATGTGTTGCT				
Jcur 7	F	GCTCAAACCTCTCAAGTTGT	TD	194	(TTG) ₄ (TTC) ₇	Monomórfico
	R	CGCGTGGACTAACTACTGGT				
Jcur 8	F	TGACAAAAGCGACAGTTCTGT	TD	168	(TC) ₁₇	Monomórfico
	R	CCCACTTCAAAACCCAAGAA				
Jcur 9	F	GGGGGACACATTAGACTTCCT	TD	246	(TC) ₁₃	Monomórfico
	R	GCGTGGACTAACACAAGCAT				
Jcur 10	F	CTAGTGATTCCACAATGCAGTC	TD	235	(GA) ₁₆	Monomórfico
	R	CAGGACATACGGGGACTGTT				
Jcur 11	F	CGAATTACCCCCGTGATTACT	TD	246	(GAA) ₁₁ (AGG) ₄	Monomórfico
	R	GGGACCAAGTAGATGGGAGA				
Jcur 12	F	CACCACAAATCACTTCTCAAGC	TD	200	(AGA) ₄ (AAG) ₁₁	Monomórfico
	R	AAGACCAAAACACCTCCAA				
Jcur 13	F	CCATGTGAACTGTCTTTCC	TD	207	(AG) ₁₉	Monomórfico
	R	CAACTCCAATAATTGAGCATCAC				
Jcur 14	F	GCCTAATTCTTCGGATTGG	TD	160	(TG) ₁₀	Monomórfico
	R	GCCATTGCTAAAGTTCTTG				

Tm = temperatura de reassociação em °C; pb = pares de bases; TD = touchdown

Tabela 14 – Locos microssatélites desenvolvidos no CBMEG e utilizados na caracterização dos acessos de pinhão-manso

(Continua)

Nome		Primer foward / reverse (5' → 3')	Tm	Produto (pb)	Motivo	Classificação
Jc1-A8	F	TATCCTTAAATTCAGCCCTCTC	TD	138/190	(CT) ₂₀	Polimórfico
	R	AGCACTAGCAAAAACGACGAC				
Jc1-A10	F	CGTTCTTCATCTGCAGGTTT	TD	185	(GT) ₅	Monomórfico
	R	CCATTCCACAACGTGTGCATTA				
Jc1-B4	F	CAACCCAACAGAAACCAAAAC	TD	285	(AG) ₁₃	Monomórfico
	R	TCTCTACCCAAACTCCCAACTT				

Tabela 14 – Locos microssatélites desenvolvidos no CBMEG e utilizados na caracterização dos acessos de pinhão-mansô

(Continuação)

Nome		Primer forward / reverse (5' → 3')	Tm	Produto (pb)	Motivo	Classificação
Jc1-B5	F	CTTAGCCATTGCCTTTTGG	TD	141/170	(AG) ₁₁	Polimórfico
	R	GCTCTCTTTCACCTGTGCCTCT				
Jc1-B6	F	CATGGAAAACCTGAAGAATC	TD	223	(CA) ₈	Monomórfico
	R	GAATGAAAGGCAACTGAAAA				
Jc1-B8	F	AAGGGCTGTAGTTTGGTTG	TD	171	(GA) ₁₅	Monomórfico
	R	ACTCCTCTTCCTCCTCACTC				
Jc1-B10-B11	F	CACTTCTAAAATCTCTCGGTTT	TD	118	(CT) ₉	Monomórfico
	R	TTCAAATCTCATCCTCTCAAGG				
Jc1-C12	F	AAAGGGGATCTGGAGGGAAGTA	TD	259	(GA) ₁₁	Monomórfico
	R	GCATAGTGGGAAGTGGGAACC				
Jc1-C2	F	GGTCAGTTCGGTCGGTTTCA	TD	249	(AC) ₂₃	Monomórfico
	R	TGTGGCTTAGGATGGGATGTTG				
Jc1-D8	F	TCAAAAGGAGACATGGGGATA	TD	250	(AC) ₉ (AT) ₄	Monomórfico
	R	AGCTTGGTGGTTCTCACTGC				
Jc1-D12	F	CTTTCTCCGCGTCTCCTTAG	TD	157	(CT) ₁₉	Monomórfico
	R	TGATGTGTTGCTCTTGGTCTTA				
Jc1-E9	F	GAGGCATAGCCCTCCAGTA	TD	165/230/250	(CA) ₅	Polimórfico
	R	GCAGAATTAGGGTTTCAAAGAG				
Jc1-E12	F	ACAAACCAACGCCATCAAC	TD	197	(AG) ₈ (GA) ₅	Monomórfico
	R	CAAATCCTCCCCCAGTAATAA				
Jc1-F2	F	ACTTTCGACTGTGTTTTCT	TD	216	(CT) ₇	Monomórfico
	R	TGCTTCTCCAGTTTCTTCA				
Jc1-F4	F	TAATGCTGAGAAGGTTGAGACT	TD	193	(CT) ₁₆	Monomórfico
	R	TGAGCGAATTATACTTAGCACA				
Jc1-F5	F	GGCGCTATCCATCGTGAGT	TD	276	(CA) ₉ (AT) ₈	Monomórfico
	R	CCAAAGGCATAGAAGGCATAAT				
Jc1-F6	F	CTCCCCCTCCCCCTTCATA	TD	259	(CT) ₁₀ (CT) ₁₈	Monomórfico
	R	CTCGCCATTCCTCCCATTTG				
Jc1-G3	F	CATATTCCCTTCCCATTTCACC	TD	184	(CG) ₆	Monomórfico
	R	TATTCCTTTGCCACCCAGAGAT				
Jc1-G10	F	TGGGTTCTTGAAAAGCACAG	TD	214	(GA) ₁₄	Monomórfico
	R	TCTTTGCGATGCTGAAGTTG				
Jc1-H4	F	TCCGCTAGCAGAATGGTCA	TD	279	(AG) ₁₀	Monomórfico
	R	ATGGAAGAGGTGGCTACAAAAT				
Jc1-H6	F	AAAGAAGGGGTAAAAGATAACA	TD	198	(AC) ₇	Monomórfico
	R	TAGGTGAATGGATGAGGTAAC				
Pinhão D1-1	F	TCACAAAAAGGATTTCGTAAAAGAT	TD	240	(GAG) ₄	Monomórfico
	R	CAGAAAGACAGGCAAGGAAAAA				
Pinhão D3-1	F	AGCCGTGCAAAGAAATATGG	TD	165	(AAG) ₃ T(CA) ₃	Monomórfico
	R	GCGTGCTTCTTGTTTTCCTC				
Pinhão E7-1	F	AGCGAGAATAGGAGCAGCAGA	TD	228/230	(TA) ₅	Polimórfico
	R	CTCGGCATCAAAAAGGGTATC				

Tabela 14 – Locos microssatélites desenvolvidos no CBMEG e utilizados na caracterização dos acessos de pinhão-mansó

(Conclusão)						
Nome		Primer foward / reverse (5′ → 3′)	Tm	Produto (pb)	Motivo	Classificação
Pinhão G5-1	F	TCCGAGGACATCACTGAGGTAAAG	TD	260	(GAG) ₄	Monomórfico
	R	AAAACAAAGGGAAAGCTGGTAAAA				
Pinhão SP6 G9-1	F	GCTAGCGGCAGGGAAATGA	TD	275	(TAA) ₄	Monomórfico
	R	GCGGGCTTGCTCGTTAGG				

Tm = temperatura de reassociação em °C; pb = pares de bases; TD = touchdown

Figura 15 – Gel de poliacrilamida mostrando perfil monomórfico do *primer* Pinhão SP6 G9-1, nos 29 acessos de pinhão-mansó

Figura 16 – Gel de poliacrilamida mostrando perfil polimórfico do *primer* Jc1 – E9, nos 29 acessos de pinhão-mansó

Para a caracterização genética entre populações ou entre grupos de acessos de espécies é necessária e aceitável a utilização de pelo menos oito locos microssatélites, a fim de se obter um

resultado confiável e uma análise consistente. Portanto, o número de locos polimórficos encontrados nesta avaliação, um total de três, não é suficiente para a caracterização genética dos acessos dos grupos estudados.

2.5.6.2.2 Avaliação do polimorfismo dos locos ISSR

2.5.6.2.2.1 Teste e seleção de *primers* ISSR

Para avaliação do polimorfismo dos locos ISSR entre os 29 acessos (Tabela 8) dos dois bancos de germoplasma aqui estudados, foram testados 42 *primers* ISSR, 14 mostraram-se adequados, produzindo fragmentos robustos, de boa intensidade, com bom perfil de amplificação. Os *primers* utilizados originaram um total de 209 locos, variando de 10 a 22 locos por *primer*, 99,52% dos locos foram polimórficos. Na Tabela 15 são mostrados os nomes dos *primers* selecionados, suas respectivas sequências e o número de fragmentos produzidos.

Tabela 15 – *Primers* selecionados, suas respectivas sequências, temperatura de reassociação e número de bandas produzidas

Nome do <i>primer</i>	Sequência (5' → 3')	T _m	Número de bandas
OMAR	GAG GAG GAG GAG GC	45,0	11
18	GAG AGA GAG AGA GAG AGA T	45,0	17
CHRIS	CAC ACA CAC ACA CAT G	47,9	16
12	GAG AGA GAG AGA GAG AGA C	47,9	10
17	GTG TGT GTG TGT	47,9	22
01	ACA CAC ACA CAC ACA CT	47,9	15
844	CTC TCT CTC TCT CTC TAC	47,9	18
M2	GCG CGA GAG AGA GAG AGA GA	50,5	12
06	CAC ACA CAC ACA CAC AG	50,5	21
07	CTC TCT CTC TCT CTC TAG	50,5	11
01	AGA GAG AGA GAG AGA GAG	54,1	20
05	CAG CAG CAG CAG CAG	54,1	12
07	GTC GTC GTC GTC GTC	54,1	10
04	GAG AGA GAG AGA GAG AGA	57,0	14

T_m = temperatura de reassociação em °C

É possível observar na Figura 17 o perfil de amplificação de um *primer* ISSR, em gel de agarose, fotografado sob luz ultravioleta.

Figura 17 – Gel de agarose mostrando perfil polimórfico de um dos *primers* ISSR utilizados (*primer* M2)

2.5.6.2.2.2 Avaliação do polimorfismo e caracterização da estrutura genética com marcadores ISSR

Para avaliar a estrutura da diversidade genética foram realizadas duas análises de variância molecular (AMOVA), com os acessos divididos *a priori*. Na primeira análise (Tabela 16) foram considerados dois grupos, cada formado por um banco de germoplasma (CPQBA e UFS). Neste caso, a análise detectou diversidade genética molecular significativa ($p < 0,01$) tanto entre grupos como dentro dos grupos. Do total da variância genética molecular verificada, 13,36% foi devido à divergência entre os grupos, enquanto que 86,64% encontram-se dentro dos grupos. O valor de Φ_{GT} foi de 0,13. Na segunda análise (Tabela 17) os acessos foram reunidos em quatro grupos, conforme teste de atribuição (Structure). Também, aqui, a análise detectou diversidade genética molecular significativa ($p < 0,01$) tanto entre grupos como dentro dos grupos. Do total da variância genética molecular verificada, 28,85% foi devido à divergência entre os quatro grupos, enquanto que 71,15% encontram-se dentro dos grupos. O valor de Φ_{GT} foi de 0,29.

Tabela 16 – Análise de variância molecular (AMOVA) para os dois grupos de acessos de *J. curcas*

Fonte de variação	GL	SQ	Componentes da variância	Varição total (%)	Estatística Φ	p
Entre grupos	1	90,89	4,87	13,36	$\Phi_{GT} = 0,13$	$p < 0,01$
Dentro de grupos	27	757,71	31,56	86,64	$1 - \Phi_{GT} = 0,87$	$p < 0,01$
Total	28	848,60	36,43			

GL = graus de liberdade; SQ = soma dos quadrados; Φ_{GT} = coeficiente de variação entre grupos

Tabela 17 – Análise da variância molecular (AMOVA) baseada no teste de atribuição (Structure), K = 4

Fonte de variação	GL	SQ	Componentes da variância	Varição total (%)	Estatística Φ	p
Entre grupos	3	231,24	8,70	28,85	$\Phi_{GT} = 0,29$	$p < 0,01$
Dentro de grupos	25	536,55	21,46	71,15	$1 - \Phi_{GT} = 0,71$	$p < 0,01$
Total	28	767,79	30,16			

GL = graus de liberdade; SQ = soma dos quadrados; Φ_{GT} = coeficiente de variação entre grupos

As estimativas de diversidade genética foram realizadas nos dois grupos de acessos de pinhão-mansão (Tabela 18), foi possível verificar uma alta taxa de polimorfismo para o Grupo 1 (78,47%) e também, para o Grupo 2 (89,95%), sendo a média dos dois grupos foi de 84,21%. Em relação ao número médio de alelos (n_a = Grupo 1 e Grupo 2), foi verificado em média de 1,99 alelos por loco, enquanto que a média do número efetivo de alelos (n_e) foi de 1,42 alelos por loco. A diversidade genética de Nei (1973) estimada para os 29 acessos indicou um valor médio de 0,26 e o Índice de Shannon (I) foi de 0,41 (Tabela 19).

Tabela 18 – Estimativas da diversidade entre os dois grupos de *Jatropha curcas*

	n_a	n_e	h	I	P
Grupo 1	1,78 (0,41)	1,39 (0,35)	0,23 (0,18)	0,36 (0,25)	78,47
Grupo 2	1,90 (0,30)	1,40 (0,34)	0,25 (0,17)	0,39 (0,22)	89,95

n_a = média do número observado de alelos; n_e = média do número efetivo de alelos; h = média da diversidade genética de NEI (1973); I = média do índice de Shannon's; P = porcentagem de locos polimórficos; () = desvio padrão

Tabela 19 – Estimativas da diversidade total (29 acessos) de *Jatropha curcas*

	n_a	n_e	h	I
Total	1,99	1,42	0,26	0,41
(Grupo 1 e Grupo 2)	(0,07)	(0,33)	(0,16)	(0,20)

n_a = média do número observado de alelos; n_e = média do número efetivo de alelos; h = média da diversidade genética de Nei (1973); I = média do índice de Shannon's; () = desvio padrão

Para análise da estruturação da diversidade sem hierarquização *a priori*, foi empregada a abordagem bayesiana realizada pelo programa STRUCTURE. Foram testados os valores K variando de um a oito, sendo o número real de K escolhido a partir dos valores de ΔK (EVANO et al., 2005). Adotando esta metodologia, verificou-se o valor ótimo de K = 4 (Figura 18). Os acessos foram então submetidos ao teste de atribuição considerando K = 4 (Figura 19). Do total de 29 acessos analisados, 48,3% foram dispostos em um único grupo (verde), 24,1% foram alocados em outro grupo (vermelho), outros 20,7% formaram outro grupo (azul) e por fim, 6,9% formaram outro grupo (amarelo).

Figura 18 – a. Número real de K escolhido a partir dos valores de ΔK (EVANO et al., 2005); b. valores de $\log \ln (K)$ e desvios para cada valor de K, calculado de acordo com o proposto por Pritchard et al. (2000)

Figura 19 – Teste de atribuição para os acessos de *J. curcas* estudados ($K = 4$). Acessos representados pelas barras verticais coloridas. A mesma cor em acessos diferentes indica que eles pertencem ao mesmo grupo. Cores diferentes no mesmo indivíduo indicam a porcentagem do genoma compartilhado com cada grupo. Identificação dos acessos ver Tabela 8. Q = coeficiente de participação do indivíduo em cada grupo

O dendrograma dos acessos foi obtido a partir das medidas de similaridade baseadas no índice de Jaccard (Anexo D) e agrupamento pelo critério UPGMA. Na Figura 20 observa-se o dendrograma obtido com base nos dados moleculares bem como a correspondência desta análise com o teste de atribuição (Structure). O valor cofenético calculado foi de 0,86 (86%). O índice médio de similaridade de Jaccard foi de 0,30, indicando que existem 30% de similaridade entre os grupos. De acordo com o resultado obtido, foi possível definir quatro grupos divergentes de *J. curcas*, sendo:

- I. **Amarelo** – menor grupo formado, por dois acessos, um do Estado de São Paulo e outro de Minas Gerais, com 94% de similaridade entre eles;
- II. **Verde** – maior grupo, 14 acessos, formado por indivíduos dos Estados de Minas Gerais, São Paulo, Goiás, Sergipe e Espírito Santo;
- III. **Azul** – Grupo formado por seis acessos, dos Estados de São Paulo, Minas Gerais e Bahia;
- IV. **Vermelho** – Grupo formado por cinco acessos brasileiros, dos Estados de Minas Gerais, Ceará, Goiás, um acesso do Canadá e outro da Indochina.

Figura 20 – Dendrograma baseado na similaridade da Jaccard e agrupamento pelo critério UPGMA em acessos de pinhão-mansô. Correlação cofenética é igual a 0,86 (10.000 reamostragens *bootstrap* para porcentagem de consistência dos nós). Cores correspondem aos principais agrupamentos encontrados e aos grupos obtidos na análise Structure

2.5.7 Discussão

No início, o alto custo para desenvolvimento e uso de marcadores microssatélites era citado como desvantagem destes marcadores moleculares. Entretanto, foram desenvolvidos outros protocolos para desenvolvimento de bibliotecas que facilitaram muito e diminuíram os custos para o uso desta técnica, como os protocolos propostos por Billotte et al. (1999) e Kijas et al. (1994). A obtenção de *primers* amplificadores de locos microssatélites tem sido realizada pela inspeção de bibliotecas genômicas, e em geral mesmo boas bibliotecas apresentam apenas 0,5 a 10% de regiões SSR, o que torna importante a obtenção de um grande número de clones para a localização e desenvolvimento de *primers* (BILLOTTE et al., 1999).

Neste estudo, o desenvolvimento da biblioteca enriquecida com locos microssatélites para *Jatropha curcas* foi realizado com sucesso, gerando os produtos esperados. Entre os insertos sequenciados 67,41% apresentaram pelo menos um loco microssatélite, dos quais 28,12% foram utilizados para desenho e síntese de *primers*. Estes locos foram selecionados com base no número de repetições do motivo SSR, pois o uso de repetições maiores facilita a detecção de polimorfismo entre os genótipos analisados. Os motivos foram variados, e os mais frequentes encontrados nesta análise foram os trinucleotídeos (59%) e dinucleotídeos (36%), e isto se deve

ao tipo de sonda utilizada no desenvolvimento da biblioteca. Foram localizadas poucas sequências repetitivas de motivos tetranucleotídeos (5%). Os motivos encontrados nos 30 pares de *primers* desenvolvidos e sintetizados pelo CBMEG foram variados, sendo que os mais freqüentes foram os dinucleotídeos (83%). Poucos motivos trinucleotídeos (13%) foram encontrados e apenas um tetranucleotídeo, este resultado também pode ser explicado devido ao tipo de sonda utilizada no desenvolvimento da biblioteca.

O método de enriquecimento no desenvolvimento da biblioteca deste estudo mostrou-se eficiente isolando 18 locos SSR específicos para a espécie, dos quais, 12 pares de *primers* foram selecionados a partir da otimização da reação de PCR e utilizados neste estudo para análise de diversidade genética das populações de pinhão-mansão. Entretanto, foi observada total ausência de polimorfismo entre e dentro das populações avaliadas (CPQBA). Dos 30 locos desenvolvidos no CBMEG (UNICAMP), 15 pares de *primers* também foram selecionados a partir da otimização de reações de PCR e utilizados neste estudo, estes também demonstraram monomorfismo entre e dentro das populações estudadas (CPQBA). Com este resultado é possível inferir que a ausência de diversidade genética para os locos e populações estudadas pode estar relacionada com a origem dos materiais, ou seja, a falta de material divergente em sua origem e que, possivelmente, muitas das populações, que atualmente são denominadas por nomes diferentes, são na verdade materiais muito semelhantes geneticamente que podem ter sido trocados por agricultores ou instituições e terem recebido outro nome e disseminado como populações diferentes. Entretanto, no estudo de diversidade genética entre os acessos dos bancos de germoplasma estudados, CPQBA e UFS, foram encontrados quatro locos polimórficos, com poucos alelos, diferenciando os bancos de germoplasma, não os acessos dentro dos bancos. Contudo, são necessários pelo menos oito locos polimórficos para a caracterização genética dos acessos dos grupos estudados, inviabilizando esta análise neste estudo.

Em outro estudo realizado com pinhão-mansão utilizando locos microssatélites e AFLP revelou uma baixa diversidade genética nos acessos chineses. Conforme Sun et al. (2008) foram avaliados 56 acessos de diferentes regiões da China e dois acessos da Malásia utilizando 17 marcadores SSR desenvolvidos no trabalho. Os autores relatam que de um total de 94 sequências SSR, 30 foram selecionadas e utilizadas no desenho de *primers*. Dos 17 locos amplificados e utilizados, foi possível observar que predominaram os motivos dinucleotídeos (14), e destes, nove foram de motivos (AC)_n, que foi justificado pelo tipo de sonda, (AC)₈, utilizada no

desenvolvimento dos marcadores. Neste caso, apenas um marcador apresentou polimorfismo (dois alelos) nos dois acessos provenientes da Malásia, os outros 16 marcadores apresentaram monomorfismo nos 58 acessos avaliados, indicando que a variabilidade genética foi muito limitada para os acessos coletados na China, ratificando a dificuldade de encontrar polimorfismo com estes marcadores, principalmente, entre acessos coletados em regiões diferentes de um mesmo país, ou seja, acessos não exóticos. A mesma situação foi observada por Basha e Sujatha (2007) utilizando marcadores RAPD e ISSR, os autores evidenciaram que não foi observado perfil molecular distinto em muitos dos acessos indianos amostrados.

Em contra partida, Pamidimarri et al. (2009) demonstram que os marcadores SSR são eficientes para detectar polimorfismo entre variedades tóxicas e não tóxicas de pinhão-manso. Entre 12 locos analisados, sete detectaram polimorfismo, permitindo aos autores inferir sobre o alto polimorfismo deste marcador em análises entre duas variedades, sua aplicabilidade em seleção assistida por marcadores e em estudos de análises de QTL. Em outro trabalho, 786 marcadores SSR desenvolvidos a partir de EST (*expressed sequence tags*) apresentaram maior abundância de motivos dinucleotídeos, seguidos por motivos trinucleotídeo e tetranucleotídeos, sendo que, o motivo AG/CT foi o mais comum (50%). Foram desenhados 406 pares de *primers*, dos quais 50 marcadores EST-SSR foram escolhidos aleatoriamente e amplificados em 25 acessos originados de diferentes regiões da Índia. Foram identificados 21 marcadores SSR polimórficos com variação de dois a quatro alelos por loco. Foi detectado também que estes marcadores polimórficos apresentaram de 57 a 95,6% de transferibilidade entre espécies de *Jatropha* e 47% de transferibilidade entre gêneros em *Ricinus communis*, também euforbiácea (YADAV et al., 2010). Wen et al. (2010) obtiveram resultados semelhantes, identificaram transferibilidade em 187 marcadores EST-SSR (sequências estas, encontradas em genes que estão principalmente envolvidos com processos biológicos e metabólicos) e 54 marcadores SSR desenvolvidos para outra euforbiácea, a mandioca. Destes marcadores, 36 EST-SSR e 20 SSR foram utilizados para analisar a diversidade genética de 45 acessos originados da Indonésia, América do Sul, Granada e China, detectando polimorfismo entre os acessos, confirmando a necessidade e importância de incluir no banco de germoplasma da espécie acessos exóticos, de diferentes países.

Em nosso estudo para entender como a diversidade encontra-se estruturada entre e dentro dos grupos formados pelos acessos dos bancos de germoplasma (CPQBA e UFS), foram

utilizados 14 marcadores ISSR, dos 42 testados. Do total de 209 locos amplificados, 99,52% foram polimórficos. O número de bandas por *primer* variou de 10 a 22. Basha e Sujatha (2007) estudando 42 acessos de pinhão-manso da Índia e um do México com marcadores ISSR, verificaram que de 100 marcadores, 48 amplificaram, e destes 29 apresentaram polimorfismo, gerando 340 bandas, 116 foram polimórficas variando de cinco a 19 bandas por *primer*. Relatam que o polimorfismo detectado utilizando 400 marcadores RAPD e 100 ISSR foi muito baixo (42,0% e 33,5% respectivamente). Wen et al. (2010) em seus estudos, utilizando 36 EST-SSR e 20 SSR para estimar a diversidade genética de 45 acessos de *J. curcas*, observaram que de 216 alelos identificados 183 (84,72%) foram polimórficos. O número de alelos de cada marcador SSR variou de um a seis, com média de 3,20, enquanto que o números de alelos para cada marcador EST-SSR variou de um a nove, com média de 4,22, mostrando que com marcadores EST-SSR foi possível obter mais alelos que com marcadores SSR.

A AMOVA foi realizada primeiro para os dois grupos de acessos de *J. curcas* (CPQBA e UFS). Neste caso, verificou-se que 86,64% da variação encontram-se dentro dos grupos e 13,36% entre eles. Para a segunda análise a AMOVA considerou os quatro grupos formados pelo teste de atribuição (Structure), e aqui também a variação dentro dos grupos maior (71,15%) e 28,85% entre eles. É possível notar na segunda um percentual maior de divergência entre os grupos, isto se justifica considerando que os grupos foram formados conforme a similaridade entre os acessos. Estes resultados são condizentes com a maioria das espécies tropicais, em que a variabilidade genética está mais estruturada dentro do que entre populações. Basha e Sujatha (2007) utilizando marcadores RAPD em um banco de germoplasma da Índia, também encontraram uma maior variação genética dentro das populações, observaram uma variação de 36% entre as populações e 64% dentro das populações, verificaram que a base genética da espécie é estreita. Em se tratando de germoplasma esta informação é relevante, pois auxilia o melhorista a entender onde buscar variabilidade genética para compor um programa de melhoramento. Em outro estudo que visou à caracterização de um banco de germoplasma com 48 acessos coletados em seis Estados da Índia, utilizando sete combinações de marcadores AFLP, foi identificado um moderado conteúdo de informação de polimorfismo (PIC), para 680 fragmentos gerados a média do PIC foi de 0,25 (TATIKONDA et al., 2009). Yadav et al. (2010) quando estudaram 25 acessos de pinhão-manso com marcadores EST-SSR, originados de oito Estados da Índia, detectaram que o conteúdo de informação de polimorfismo (PIC) indicou um

baixo a moderato nível informativo, aqui a média de PIC também foi de 0,25, sendo que muitos dos marcadores apresentaram um baixo valor de PIC ($< 0,25$) .

As estimativas de diversidade genética estimada utilizando marcadores ISSR, para os dois grupos formados pelos acessos dos bancos de germoplasma do CPQBA e UFS, informaram que os dois grupos apresentaram uma alta taxa de polimorfismo, média de 84,21%, sendo que o Grupo 2 (UFS) apresentou um maior índice (89,95%). O número médio total de alelos (n_a) foi de 1,99 alelos por loco e o número efetivo de alelos (n_e) foi de 1,42 alelos por loco. A diversidade genética de Nei (1973) indicou um valor médio de 0,26, indicando uma baixa diversidade genética dentro dos grupos. O Índice de Shannon (I), para os 29 acessos, foi de 0,41, considerado um valor baixo de diversidade genética. Este índice de diversidade é maior quando comparado ao de diversidade genética de Nei (1973), isto se justifica considerando que o Índice de Shannon dá maior peso aos alelos que ocorrem em baixa frequência nos locos estudados. Os parâmetro de diversidade genética obtidos por Wen et al. (2010), estudando a diversidade entre e dentro de cinco grupos de acessos formados pela região de origem de cada acesso utilizando 183 EST-SSR e SSR, evidenciaram uma taxa média de polimorfismo de 84%. O número médio total de alelos (n_a) foi de dois alelos por loco e o número efetivo de alelos (n_e) foi de 1,69 alelos por loco, valores muito próximo do valor médio obtido nos grupos do presente estudo. A diversidade genética de Nei (1973) (h) indicou um valor médio de 0,38 e o valor médio do Índice de Shannon observado foi de 0,56, os autores consideram que estes dois últimos resultados mostram que a coleção apresenta restrita a moderada base genética. O nível de diversidade genética foi maior entre os acessos procedentes da América e Yunnan, China. Ranade et al. (2007) avaliaram 23 acessos de *J. curcas* de diferentes lugares da Índia utilizando sete marcadores RAPD e quatro DAMD (*directed amplification of minisatellite DNA*). Neste caso, os autores identificaram que a diversidade genética de Nei (1973) (h) apresentou, para os quatro grupos formados, um valor médio de 0,23 e o valor médio do Índice de Shannon observado foi de 0,34. A porcentagem de locos polimórficos foi de 3,94 a 39,37%. Com base no material avaliado e nos resultados obtidos no trabalho, os autores afirmam que o índice de diversidade genética, em *habitats* da espécie em que a intervenção humana é bem pequena ou inexistente, pode contribuir mais substancialmente na heterogeneidade do germoplasma de *Jatropha curcas* para fatores como adaptabilidade e produção de óleo.

De acordo com a análise bayesiana, todos os acessos de pinhão-manso avaliados neste estudo passaram a ser alocados em quatro grupos. Todos os acessos apresentaram $Q > 0,8$, isto infere que os marcadores mostram que cada grupo formado contém acessos que apresentam bastante semelhança entre si, formando grupos bem definidos e consistentes. Apenas os acessos 11 (UFSCAR) e 13 (JCUFLA001 (01)) apresentam um Q com aproximadamente 95 e 80%, respectivamente, de participação no grupo azul e apenas cinco e 20%, respectivamente, de participação no grupo vermelho, representando a semelhança genética entre os acessos, ou seja, os acessos 11 e 13 apresentam cinco e 20%, respectivamente, de semelhança genética com os acessos 04 (Filomena 38), 07 (Fortaleza 26), 06 (Glyn 23), 10 (Camboja), 12 (Canádia), 23 (JC011URVGO) e 24 (JC012URVMG). Os grupos formados não apresentaram nenhuma relação entre os agrupamentos formados e os locais de origem dos acessos. Em um estudo realizado com a mamona (*Ricinus communis*) para estimar a diversidade genética de acessos do banco de germoplasma da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), do Instituto Agronômico de Campinas (IAC) e da UNESP – Botucatu, a partir de 41 locos SSR. O teste de atribuição (Structure) revelou a formação de dois grupos geneticamente distintos, sendo um grupo composto pelos acessos da EMBRAPA e o outro grupo composto pelos acessos do IAC e pelos genótipos da UNESP - Botucatu. Este resultado permitiu ao autor inferir que a diversidade genética da mamona está bem representada nesses bancos de germoplasma, e foi considerado de extrema importância para programas de melhoramento da mamoneira (BAJAY, 2009). Analisando acessos brasileiros de um banco de germoplasma de cúrcuma (*Curcuma longa* L.) juntamente com acessos de outros países utilizando 19 marcadores microsatélites, Sigrist (2009), observou, de acordo com a análise Structure, a formação de três grupos. O primeiro grupo formado por praticamente todos os acessos brasileiros, o segundo formado por alguns acessos paulistas, um acesso de Belém (PA) e pelos acessos de Porto Rico, o terceiro grupo foi constituído pelos acessos vindos da Índia. O autor conclui em seu trabalho que o banco de germoplasma brasileiro analisado apresenta, no geral, pouca variabilidade genética, reforçando mais uma vez a importância da inserção de materiais divergentes em sua origem, em bancos de germoplasma, visando aumentar a variabilidade genética nos mesmos, garantindo boas condições para compor programas de melhoramento. Odong et al. (2011) enfatizam a importância de obter informações sobre a estrutura genética de banco de germoplasma tanto para conservação como para a utilização de recursos genéticos reunidos e bancos de genes, sendo estas informações

também um importante aspecto em estudos de associação. Neste contexto, os autores destacam a eficiência e confiabilidade do uso do programa Structure no estudo em bancos de germoplasma com dados gerados a partir do uso de marcadores moleculares, comparando com técnicas tradicionais como UPGMA e Ward.

Os resultados obtidos com o Structure foram bastante coerentes com o demonstrado posteriormente pelo agrupamento empregando o critério UPGMA empregando o índice de similaridade de Jaccard. Este dendrograma baseado na similaridade genética formou os mesmos quatro grupos de acessos que o formado no teste de atribuição, tornando ainda mais consistente os resultados obtidos na presente análise. Não foi observada nenhuma relação entre os genótipos dos acessos estudados e seus locais de origem, uma das razões para este resultado pode estar no fato de ter havido uma fonte de origem comum entre estes acessos. O valor cofenético (86%), sugere que o dendrograma explica praticamente a totalidade da matriz de similaridade original. O índice médio de similaridade de Jaccard indicou que existem 30% de similaridade entre os grupos e a amplitude de similaridade foi de 0,23 a 0,94.

De acordo com a identificação da Tabela 8 os acessos mais similares foram:

94% de similaridade – 1 e 3;

74% de similaridade – 3 e 2;

71% de similaridade – 9 e 3; 9 e 5;

70% de similaridade – 9 e 1;

Os acessos menos similares foram:

4% de similaridade – 12 e 1; 12 e 2; 12 e 3; 12 e 8; 12 e 9; 12 e 14; 12 e 15, 12 e 18; 12 e 19; 12 e 20; 12 e 21; 12 e 22; 12 e 25; 12 e 26; 12 e 27; 12 e 28;

6% de similaridade – 12 e 16.

Com estes dados é possível inferir que os acessos 1 (CPQBA 36) e 3 (Gonçalo 34) podem ser considerados geneticamente iguais, já o acesso 12 (Canadia) é o menos similar geneticamente da maioria dos acessos, porém apresenta 50% de similaridade com o acesso 10 (Camboja). No trabalho desenvolvido por Wen et al. (2010) os 45 acessos de *J. curcas* formaram seis grupos que apresentaram um índice médio de similaridade de Jaccard de 0,76, indicando que existem 76% de similaridade entre os grupos e a amplitude de similaridade variou de 0,55 a 0,92. Com os resultados obtidos os autores sugeriram que os genótipos estão correlacionados com suas origens geográficas e embora alguns cruzamentos tenham ocorridos. Basha e Sujatha (2007) quando

avaliaram 42 acessos de pinhão-manso originados da Índia e um originado do México com marcadores ISSR e RAPD encontraram resultados semelhantes. A amplitude da matriz de similaridade baseados em análise com RAPD variou de 0,48 a 0,95 e num limiar de 70% revelando a formação de seis grupos, sendo que um agrupamento reuniu 34 acessos. A amplitude da matriz de similaridade baseados em análise com ISSR variou de 0,57 a 0,97 e num limiar de 80% separou os acessos em sete grupos. O dendrograma baseado nos dados dos dois marcadores mostrou o agrupamento de 35 dos 43 acessos estudados (83%) em dois grupos. Acessos coletados na mesma região, bem como acessos coletados em diferentes regiões da Índia formaram um grupo e mostraram-se geneticamente próximos, indicando claramente que a diferenciação geográfica do germoplasma hindu não é ampla. Através deste estudo verificou-se também uma ampla distância genética entre os acessos da Índia e o genótipo Mexicano. Sun et al. (2008) no estudo de 56 acessos da China e dois da Malásia com marcadores AFLP observaram que as estimativas de Jaccard apresentaram amplitude de 0,86 a 0,99, sendo que a média foi de 0,96. Os 58 acessos formaram três grupos, o grupo um com 27 acessos e o grupo dois com um acesso, todos chineses e o grupo três reuniu o restante dos acessos chineses (28), todos de uma mesma localidade e os dois acessos da Malásia, os autores sugerem que os acessos chineses deste último grupo tenham se distanciado dos demais devido a uma mutação somática que pode ter sido acumulada por propagação vegetativa. Tatikonda et al. (2009) observaram que os 48 acessos de *J. curcas*, analisados com marcadores AFLP, formaram quatro grupos no dendrograma obtido pelo agrupamento UPGMA com as estimativas de Jaccard, o coeficiente de similaridade variou de 0,43 a 0,97 sugerindo uma ampla base genética. O dendrograma serviu para entender as analogias entre os acessos coletados em seis Estados da Índia. Na caracterização isoenzimática de acessos de pinhão-manso, Gois et al. (2006), puderam identificar através do dendrograma de similaridades os acessos com maior similaridade e os acessos mais divergentes. Os pesquisadores citam que estas informações são úteis para conhecer a variabilidade de bancos de germoplasma, permitindo acompanhar sua manutenção durante a multiplicação dos acessos e melhorar a amostragem dos mesmos. Yadav et al. (2010) com os dados da matriz de similaridade de Jaccard, gerados por 21 marcadores EST-SSR em 25 acessos de *Jatropha curcas* coletados em diferentes regiões da Índia, obtiveram um dendrograma que apresentou um coeficiente médio de similaridade de 0,71, com amplitude que variou de 0,44 a 0,94. Foram formados três grupos principais, a distribuição dos acessos em diferentes grupos, como no presente estudo, foi

independente de suas origens geográficas. Resultado similar de agrupamento independente de origem geográfica foi observada por Sudheer et al. (2008) que utilizando marcadores RAPD e AFLP na análise de 28 acessos coletados em diversos Estados hindus. Por fim, em outra pesquisa desenvolvida por Basha et al. (2009), a diversidade genética de 72 acessos de pinhão-manso procedentes de 13 países foi estimada através de marcadores SSR, RAPD e ISSR (SCAR). A caracterização molecular revelou polimorfismo de 61,8% (RAPD) e 35,5% (ISSR). A matriz de similaridade genética foi elaborada usando estes dois marcadores, pois o teste de Mantel para congruência entre as matrizes de dados gerados evidenciou correlação positiva ($r = 0,84$). A similaridade entre os acessos foi determinada pelo coeficiente de similaridade de Jaccard. O dendrograma construído com base nestes dados separou os acessos e oito grupos diferentes. Foi observado um grande grupo que reuniu 40 acessos incluindo todos os hindus, chineses, filipinos, dois mexicanos, oito de Madagascar, quatro de diferentes países da África, um do Vietnã e outro da Tailândia e outro grupo que reuniu 21 acessos originados do México e ainda, grupos menores que reuniram os outros acessos. Com base no dendrograma observou-se baixa variação genética nos acessos coletados em diferentes países e segregação genética de acessos da América Central. Os pesquisadores relatam que a diversidade genética limitada verificada nos acessos trazidos de diversos países confirma o fato de que a constituição da base genética do germoplasma nestes países foi efetuada por um pequeno número de introduções, que os grupos formados por germoplasma de diferentes países, evidenciando um estreitamento genético entre os mesmos, indicam que houve uma fonte de origem comum entre eles, que populações geograficamente isoladas acumularam diferenças genéticas que as adaptaram a diferentes ambientes e que a baixa diversidade genética na espécie reflete o modo de propagação, o comportamento reprodutivo e o modo com que cada uma foi domesticada.

Com base em todas as análises realizadas e resultados obtidos neste estudo é possível inferir que apesar de ter sido encontrada variabilidade de alelos evidenciada pelo polimorfismo dentro dos grupos representados pelos bancos de germoplasma estudados, não se verificou a presença de diversidade genética significativa entre os acessos. A ausência de polimorfismo entre as populações amostradas, a baixa diversidade genética encontrada nos bancos de germoplasma avaliados e a falta de correlação entre os grupos formados pelos métodos de agrupamento utilizados com a origem geográfica dos mesmos, podem ter várias explicações possíveis. A primeira hipótese a ser considerada é uma possível origem comum dos acessos, outras hipóteses

que podem ser cogitadas são a introdução de poucos acessos de pinhão-manso no Brasil e a troca de genótipos entre pesquisadores, instituições e agricultores resultando no estreitamento da base genética dos acessos estudados no presente trabalho.

3 CONCLUSÕES

Os resultados do presente trabalho permitem concluir que:

- a) O método de enriquecimento utilizado foi eficiente em isolar locos microssatélites específicos para *Jatropha curcas* L.;
- b) A ausência de polimorfismo entre as populações estudadas revela a necessidade de incluir no estudo populações mais polimórficas para validar os *primers* microssatélites desenvolvidos;
- c) A diversidade genética entre os acessos avaliados neste estudo foi baixa com base nos marcadores moleculares utilizados;
- d) Não foi possível estabelecer uma correlação dos genótipos com sua origem geográfica, que pode ser explicada por uma fonte de origem comum entre os acessos;
- e) A baixa diversidade genética estimada dentro dos grupos deixa bastante evidente a necessidade e importância de reunir o maior número possível de acessos de diferentes regiões e países para formar o banco de germoplasma da espécie, visando obter o máximo de variabilidade, garantindo sua conservação e também, não menos importante, viabilizar programas de melhoramento com esta euforbiácea, que apresenta um considerável potencial para exploração econômica, que mesmo sem informações pertinentes, já está sendo cultivada em regiões do país para fins comerciais.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, C. M. A.; LIMA, S. E. N.; LIMA, G. S. A.; BRITO, J. Z.; DONATO, V. M. T. S.; SILVA, M. V. Caracterização molecular de cultivares de cana-de-açúcar utilizando marcadores ISSR. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, Edição Especial, p. 1771 -1776, 2009.
- ALVES, R. M. **Caracterização genética de populações de cupuaçuzeiro, *Theobroma grandiflorum* (Willd. ex. Spreng.) Shum., por marcadores microssatélites e descritores botânico-agronômicos**. 2002, 159p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2002.
- ANDRADE, G. A.; CARAMORI, P. H.; CAVIGLIONE, J. H.; OLIVEIRA, D.; RIBEIRO, A. M. A. Zoneamento agroclimático para a cultura do pinhão-manso (*Jatropha curcas*) no Estado do Paraná. **Revista Brasileira de Agrometeorologia**, Sete Lagoas, v. 15, n. 2, p. 178-183, 2007.
- ARAÚJO, E. C. E.; RIBEIRO, A. M. B. Avaliação fenológica do pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) no município de Teresina – PI. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PLANTAS OLEAGINOSAS, ÓLEOS, GORDURAS E BIODIESEL, 5., 2008, Lavras, **Anais...** Lavras: UFLA, 2008. p. 1468-1476.
- 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 Oleaginosas e Fibrosas**, Campina Grande, v. 8, p. 789-799, 2004.
- ÁVILA, T. T.; ÁVILA, D. T.; SILVA, S. D. A. Características fenotípicas do pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) da região do planalto central do Estado do Rio Grande Do Sul. **Revista Brasileira de Agroecologia**, Cruz Alta, v. 4, n. 2, p. 4269-4272, 2009.
- BAJAY, M. M. **Desenvolvimento de marcadores microssatélites e caracterização do germoplasma de mamona (*Ricinus communis* L.)**. 2009. 96 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.
- BASHA, S. D.; FRANCIS, G.; MAKKAR, 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. **Plant Science**, Clare, v. 176, n. 6, p. 812-813, 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**, Dordrecht, v. 156, p. 375–386, 2007.

BELTRÃO, N. E. M. 2006. **Considerações gerais sobre o pinhão manso (*Jatrofa curcas* L.) e a necessidade urgente de pesquisas, desenvolvimento e inovações tecnológicas para esta planta nas condições brasileiras.** Disponível em: <<http://www.mda.gov.br/saf/arquivos/0705910897.doc>>. Acesso em: 27 abr. 2008.

BERCHMANS, H. J.; HIRATA, S. Biodiesel production from crude *Jatropha curcas* L. seed oil with a high content of free fatty acids. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 99, p. 1716-1721, 2008.

BILLOTTE, N.; LAGODA, P. J. R.; RIESTERUCCI, A. M.; BAURENS, F. C. Microsatellite-enriched libraries: applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops, **Fruits**, Les Ulis, v. 54, p. 277-288, 1999.

BIODIESEL. 2008. **O Biodiesel.** Disponível em: <<http://www.biodiesel.gov.br>>. Acesso em: 27 abr. 2008.

BLAIR, M. W.; PANAUD, O.; MICCOUCH, S. R. Inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification for analysis of microsatellite motif frequency and fingerprinting in rice (*Oryza sativa* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 98, p. 780-792, 1999.

BORBA, R. S.; GARCIA, M. S.; KOVALLESKI, A.; OLIVEIRA, A. C.; ZIMMER, P. D.; BRANCO, J. S. C.; MALONE, G. Dissimilaridade genética de linhagens de *Trichogramma* Westwood (Hymenoptera: Trichogrammatidae) através de marcadores moleculares ISSR. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 34, p. 565-569, 2005.

BORÉM, A. **Melhoramento de espécies cultivadas.** Viçosa: UFV, 2005. 969p.

BORÉM, A.; CAIXETA, E. T. **Marcadores moleculares.** Viçosa: UFV, 2006, 374p.

BRASIL.2010. **Programa Nacional de Produção e uso do Biodiesel – Programa.** Disponível em: <<http://www.biodiesel.gov.br/programa.html>>. Acesso em: 16 out. 2010.

BRASIL. Instrução Normativa nº 4 de 14 de Janeiro de 2008 – **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 15 jan. 2008. Seção1, nº 10, p. 4-5.

BRASIL. Lei n.11097, de 13 de janeiro de 2005. Dispõe sobre a introdução do biodiesel na matriz energética brasileira, altera Leis afins e dá outras providências. **Diário Oficial**, Brasília, 14 jan. 2005.

BRASIL. Ministério da Indústria e do Comércio. Secretária de Tecnologia Industrial. Produção de combustíveis líquidos a partir de óleos vegetais. Brasília, 1985. 364p. (MICSTI. Documentos, 16).

CÁCERES, D. R.; PORTAS, A. A.; TESTA, J. E. A. 2007. **Pinhão-manso.** Disponível em: <<http://www.cati.sp.gov.br/novacati/tecnologias/catiresponde/cr59.htm>>. Acesso em: 24 abr. 2008.

CARNEIRO, R. A. F. **A produção de Biodiesel na Bahia**. 2003. Disponível em: <http://www.sei.ba.gov.br/publicacoes/publicacoes_sei/bahia_analise/conj_planejamento/pdf/c&p112/05.pdf>. Acesso em: 27 abr. 2008.

CARNEIRO, N. M. C.; FRAGA, A. C.; CASTRO NETO, P. A substituição de combustível fóssil por biodiesel e o mercado de carbono. IN: CONGRESSO BRASILEIRO DE PLANTAS OLEAGINOSAS, ÓLEOS, GORDURAS E BIODIESEL, 3., 2006, Varginha. **Revista de Resumos**. Lavras: Ufla, 2006, v. 1. p. 212-212.

CARNIELLI, F. **O combustível do futuro**. 2003. Disponível em: <<http://www.ufmg.br/boletim/bol1413/quarta.shtml>>. Acesso em: 26 abr. 2008.

CARVALHO, C. R.; CLARINDO, W. R.; PRAÇA, M. M.; ARAÚJO, F. S.; CAREIS, N. Genome size, base composition and karyotype of *Jatropha curcas* L., an important biofuel plant. **Plant Science**, Clare, v. 174, n. 6, p. 613-617, 2008.

CASTRO, C. M.; DEVIDE, A. C. P.; ANACLETO, A. H. Produção de pinhão manso em sistema familiar. In: CONGRESSE BRASILEIRO DE PLANTAS OLEAGINOSAS, ÓLEOS, GORDURAS E BIODIESEL, 5., 2008, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 2008. p. 2074-2807.

CHAMBERS, J. K.; MACAVOY, E. S. Microsatellite: Consensus and controversy. **Comparative Biochemistry and Physiology**, New York, v. 126, p. 455-476, 2000.

CHARTERS, Y. M.; WILKINSON, M. J. The use of self-pollinated progenies as 'in-groups' for the genetic characterization of cocoa germplasm, **Theoretical Applied Genetics**, Berlin, v. 100, n. 1, p. 160-166, 2000.

COCKERHAM, C. C. Variance of gene frequencies. **Evolution**, Malden, v. 23, p. 72-84, 1969.

COELHO, A.S.G. **Bood: avaliação de dendrogramas baseados em estimativas de distâncias/similaridades genéticas através do procedimento de bootstrap: versão 3.01**. Goiânia: Universidade Federal de Goiás, 2001. 1 CD-ROM.

CONDIT, R.; HUBBELL, S. P. Abundance and DNA frequency of 2-base repeat regions in tropical tree genomes. **Genome**, Ottawa, v. 34, p. 66-71, 1991.

CORTESÃO, M. **Culturas tropicais, plantas oleaginosas: coqueiro, rícino, purgueira, aleurites**. Lisboa: Clássica, 1957. p. 163-180.

CRESTE, S.; TULMANN NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology Reports**, Dordrecht, v. 19, p. 1-8, 2001.

CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. New York: Columbia University Press, 1981. 1262 p.

DIAS, L. A. S.; CARVALHO, E.; GUIMARÃES, L. M. S.; DIAS, D. C. F. S.; LAVIOLA, B. G.; LEME, L. P. Variabilidade genética de pinhão-manso plantado na região de Viçosa, MG, Brasil. In: CONGRESSO DA REDE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE BIODIESEL, 2., 2007, Brasília. **Anais...** Brasília: MCT/ABIPTI, 2007. p. 1-5.

DON, R. H.; COX, P. T.; WAINWRIGHT, B. J.; BARKER, K.; MATTICK, J. S. 'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. **Nucleic Acids Research**, London, v. 19, n. 14, p. 4008, 1991.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA fresh tissue. **Focus**, Rockville, v. 12, p. 13-15, 1990.

DUARTE, A. Esperança nacional. **Biodieselbr**, Curitiba, n. 5, p. 24-31, 2008.

EMBRAPA AGROENERGIA. **Visão estratégica do uso de palmáceas para bioenergia e ações de pesquisa, desenvolvimento e inovação**. Brasília, 2008a.1 folder.

EMBRAPA AGROENERGIA. **Pinhão Manso. Pesquisa, desenvolvimento e inovação: tecnologia para biocombustíveis**. Brasília, 2008b.1 folder.

EPAMIG (Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais). **Coletânea sobre pinhão-manso**. Disponível em: <http://www.epamig.br/index.php?option=com_docman&task=cat_view&gid=63&Itemid=116>. Acesso em: 26 abr. 2008.

ESSELMAN, E. J.; JIANQIANG, L.; CRAWFORD, D. J.; WINDUSS, J. L.; WOLFE, A. D. Clonal diversity in the rare *Calamagrostis porteri* ssp. *Inspersata* (Poaceae): comparative results for allozymes and random amplified polymorphic DNA (RAPD) and inter simple sequence repeat (ISSR) markers. **Molecular Ecology**, Malden, v. 8, p. 443-451, 1999.

EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. **Molecular Ecology**, Malden, n. 14, p. 2611-2620, 2005.

EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P. E.; QUATTRO, J. M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**, Bethesda, v. 131, p. 179-101, 1992.

FALCONER, D. S.; MACKAY, T. F. C. **Introduction to quantitative genetics**. New York: Longman Scientific & Technicals, 1989. 438p.

FANG, D. Q.; ROOSE, M. L. Identification of closely related citrus cultivars with inter-simple sequence repeat markers. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 95, p. 408-417, 1997.

FERRAZ, D. K.; ARTES, R.; MANTOVANI, W.; MAGALHÃES, L. M. Fenologia de árvores em fragmento de mata em São Paulo-SP. **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v. 59, n. 2, p. 305-317, 1999.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares na análise genética**. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220 p.

FIELD, D.; WILLS, C. Long, polymorphic microsatellites in simple organisms. **Proceedings: Biological Sciences**, London, v. 263, n. 1367, p. 209-215, 1996.

FUTUYMA, D. J. **Evolutionary Biology**. 3 ed., Sunderland: Sinauer Associates, 1998. 196p.

FUTUYMA, D. J. **Biologia evolutiva**. 2 ed. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1993. 631p.

GLOOBO RURAL. 2008. **Biodiesel no Brasil**. Disponível em: <<http://globoruraltv.globo.com/GRural/0,27062,LTO0-4370-320848,00.html>>. Acesso em: 10 nov. 2008.

GOIS, I. B.; SILVA, R.; BOARI, A. J.; OLIVEIRA, A. S.; FRAGA, A. C. **Caracterização isoenzimática de acessos de pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.)**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA, 2., 2006. Disponível em: <http://www.cnpa.embrapa.br/produtos/mamona/publicacoes/trabalhos_cbm2/006.pdf>. Acesso em: 28 abr. 2008.

GOLDEMBERG, J.; LUCON, O. Energia e meio ambiente no Brasil. **Estudos Avançados**, São Paulo, v. 21, n. 59, p. 7-20, 2007.

GOULÃO, L.; OLIVEIRA, C. M. Molecular characterisation of cultivars of apple (*Malus x domestica* Borkh.) using microsatellite (SSR and ISSR) markers. **Euphytica**, Dordrecht, v. 122, p. 81-89, 2001.

GOULART, M. F.; RIBEIRO, S. P.; LOVATO, M. B. Genetic, morphological and spatial characterization of two populations of *Mabea fistulifera* Mart. (Euphobiaceae), in different successional stages. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 48, n. 2, p. 275-284, 2005.

GÜBITZ, G. M.; MITTELBACH M.; TRABI, M. Exploitation of the tropical oil seed plant *Jatropha curcas* L. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 67, p. 73-82, 1999.

GUPTA, M.; CHYI, Y. S.; ROMERO-SEVERSON, J.; OWEN, J. L. Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, n. 89, p. 998-1006, 1994.

HALLAUER, A. R.; MIRANDA, J. B. *Germplasm*. In: HALLAUER, A. R.; MIRANDA, J. B. **Quantitative genetics in maize breeding**. Iowa, 2. ed., 1988. cap. 11, p.375-396.

HAMADA, H.; PETRINO, M. G.; KAKUNAGA, T. A novel repeated element with Z-DNA forming potential is widely found in evolutionarily diverse eukaryotic genomes. **Proceedings of National Academy of Sciences of United States of America**, Washington, v. 79, p. 6465-6469, 1982.

HAMRICK, J. L. **Isozymes and analysis of genetic structure in plants populations**. In: Soltis, D. E.; Soltis, P. S. (Ed.). London: Chapman and Hall, 1989. p. 335-348.

HAMRICK, J. L. Plant population genetics and evolution. **American Journal of Botany**, Saint Louis, v. 69, n. 10, p. 1685-1693, 1982.

HEIFFIG, L. S.; CÂMARA, G. M. S. Pinhão-mansô exige baixo investimento, com retorno rápido. **Visão Agrícola**, Piracicaba, n. 8, p. 15-17, 2008.

HOSBINO, A. A.; PALARIERI, D. A.; BRAVO, J. P.; PEREIRA, T. E. B.; LOPES, G. R. Marcador microssatélite na conservação de germoplasma vegetal. **Biotechnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, n. 29, 2002.

HUANG, X.; MADAN, A. Cap3: a DNA sequence assembly program. **Genome Research**, New York, v. 9, n. 9, p. 868-877, 1999.

HUFF, D. R.; PEAKALL, R.; SMOUSE, P. E. RAPD variation within and among natural populations of outcrossing buffalograss (*Buchoë dactuloides* (Nutt.) Elgen), **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 86, p. 927-934, 1993.

JOSHI, S. P.; GUPTA, V. S.; AGGARWAL, R. K.; RANJEKAR, P. K.; BRAR, D. S. Genetic diversity and phylogenetic relationship as revealed by inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism in the genus *Oryza*. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 100, p. 1311-1320, 2000.

JUHÁSZ, A. C. P.; PIMENTA, S.; SOARES, B. O.; MORAIS, D. L. B.; RABELLO, H. O. Biologia floral e polinização artificial de pinhão-mansô no norte de Minas Gerais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 44, n. 9, p. 1073-1077, 2009.

KIJAS, J. M.; FOWLER, J. C.; GARBETT, C. A.; THOMAS, M. R. Enrichment of microsatellites from the Citrus genome using biotinylated oligonucleotide sequences bound to streptavidin-coated magnetic particles. **BioTechniques**, New York, v. 16, p. 656-662, 1994.

KIMURA, M.; CROW, J. F. The number of alleles that can be maintained in a finite population. **Genetics**, Bethesda, v. 49, p. 725-738, 1964.

LEWONTIN, R. C. The apportionment of human diversity. **Evolutionary Biology**, New York, v. 6, p. 381-398, 1972.

LUO, C.-W.; LI, R.; CHEN, Y.; SUN, Y.-Y. Floral display and breeding system of *Jatropha curcas* L. **Forestry Studies in China**, Beijing, v. 9, n. 2, p. 114-119, June 2007.

MARKERT, C. L.; MOLLER, F. Multiple forms of enzymes: issue, ontogenetic and species specific patterns. **Proceeding of the Natational Academy of Science**, Washington, v. 45, p. 753-763, 1959.

MARQUES, D. A.; FERRARI, R. A. O papel das novas biotecnologias no melhoramento genético do pinhão mansô. **Biológico**, São Paulo, v. 70, n. 2, p. 65-67, 2008.

MARTIN, G. ; MAYEUX, A. Réflexions sur les cultures oléagineuses énergétiques. II. -Le Pourghère (*Jatropha curcas* L.): un carburant possible. **Oléagineux, Corps gras, Lipides**, Montrouge, v. 39, n.5, p. 283-287, 1984.

MARTINS, W. S.; LUCAS, D. C. S.; NEVES, K. F. S.; BERTIOLI, D.J. **WebSat - A Web Software for MicroSatellite Marker Development**. Disponível em: <<http://www.bioinformation.net/003/005900032009.pdf>>. Acesso em : 09 jan. 2010.

MATIOLI, S. R.; PASSOS-BUENO, M. R. S. Métodos baseados em PCR para análise de polimorfismos de ácidos nucléicos. In: Matioli, S. R. (Ed.). **Biologia Molecular e Evolução**. Ribeirão Preto: Holos, 2001. p. 153-161.

MELO, J. C.; BRANDER JUNIOR, W.; CAMPOS, R. J. A.; PACHECO, J. G. A.; SCHULER, A. R. P.; STRAGEVITCH, L. 2006. **Avaliação Preliminar do Potencial do Pinhão Manso para a Produção de Biodiesel**. Disponível em: <<http://www.biodiesel.gov.br/docs/congresso2006/producao/Preliminar20.pdf>>. Acesso em: 15 ago. 2009.

MIRAGAYA, J. C. G. Biodiesel: tendências no mundo e no Brasil. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 26, n. 229, p. 7-13, 2005.

MORGAM, A. 2010. **União Européia cria lei para assegurar biocombustível sustentável**. Disponível em: < <http://producaodebiodiesel.com.br/mundo/uniao-europeia-lei-biocombustivel-sustentavel/>>. Acesso em: 21 nov. 2010.

MORGANTE, M.; OLIVIERI, A. M. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. **The Plant Journal**, Heslington, v. 3, p. 175-182, 1993.

MYBELOJARDIM. **Óleo bruto (cru) de pinhão-manso está sendo testado para ser usado diretamente em motores diesel marítimos sem precisar ser transformado em biodiesel**. Disponível em: <<http://mybelojardim.com/oleo-bruto-cru-de-pinhao-manso-estar-sendo-testado-para-ser-usado-direitamente-em-motores-diesel-maritimos-sem-precisar-ser-transformado-em-biodiesel/>>. Acesso em: 21 nov. 2010.

NAGAOKA, T.; OGIHARA, Y. Applicability of inter-simple sequence repeat polymorphisms in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 94, p. 597-602, 1997.

NASS, L. L. Utilização de recursos genéticos vegetais no melhoramento. In NASS, L. L.; MELO, I. S.; VALADARES-INGLIS, M. C. (Eds.). **Recursos genéticos e melhoramento de plantas**. Rondonópolis: Fundação MT, 2001. p. 29-56.

NEI, M.; LI, W. H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 74, p. 5267-5273, 1979.

NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**, Bethesda, v. 89, n. 3, p. 583-590, 1978.

NEI, M. F-statistics and analysis of gene diversity in subdivided population. **Annals of Human Genetics**, Malden, v. 41, p. 225-33, 1977.

NEI, M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 70, p. 3321-3323, 1973.

NOBELPRIZE. 1993. **Nobelprize.org**. Disponível em: < http://nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1993/press.html >. Acesso em: 15 jul. 2008.

NYBOM, H.; BARTISH, I. Effects of life history traits and sampling strategies on genetic diversity estimates obtained with RAPD markers in plants. **Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics**, Zurich, v. 3/2, p. 93-114, 2000.

ODONG, T. L.; van HEERWAARDEN, J.; JANSEN, J.; van HINTUM, T. J. L.; van EUWIJK, F. A. Determination of genetic structure of germplasm collections: are traditional hierarchical clustering methods appropriate for molecular marker data? **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, 2011. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21472410> >. Acesso em: 18 maio 2011.

OLIVEIRA, F. A. M. A produção de óleos vegetais de macaúba e seus co-produtos na região metropolitana de Belo Horizonte. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PLANTAS OLEAGINOSAS, ÓLEOS, GORDURAS E BIODIESEL, 3., 2006, Varginha. **Anais...** Lavras: Ufla, 2006, v. 1, p. 1203-1209.

OLIVEIRA, F. I. C.; CAVALCANTI, J. J. V.; SOUZA, F. X.; BERTINI, C. H. C. M.; LIMA, E.N. **Variabilidade genética de genótipos de cajazeira identificada por marcadores ISSR**. Disponível em: <<http://www.cnpat.embrapa.br/cpd/metast/metast09/AT09090.pdf>>. Acesso em: 12 jul. 2010.

OPENSHAW, K. A review of *Jatropha curcas*: an oil plant of unfulfilled promise. **Biomass and Bioenergy**, Amsterdam, v. 19, p. 1-15, 2000.

ORGADEM (Organização de Apoio ao Desenvolvimento dos Municípios). **Pinhão Manso – *Jatropha curcas* L.** Disponível em: < <http://www.orgadem.org.br/pinhao.htm> >. Acesso em: 25 abr. 2008.

PAIVA NETO, V. B.; BRENHA, J. A. M.; FREITAS, F. B.; ZUFFO, M. C. R.; ALVAREZ, R. C. F. Aspectos da biologia reprodutiva de *Jatropha curcas* L. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 3, p. 558-563, 2010.

PAMIDIMARRI, D. V. N. S.; SINGH, S.; MASTAN, S.G; PATEL, J; REDDY, P. Molecular characterization and identification of markers for toxic and non-toxic varieties of *Jatropha curcas* L. using RAPD, AFLP and SSR markers. **Molecular Biology Reports**, Dordrecht, v. 36, p. 1357-1364, 2009.

PARSONS, B. J.; NEWBURY, H. J.; JACKSON, M. T.; FORD-LLOYD, B. V. Contrasting genetic diversity relationships are revealed in rice (*Oryza sativa* L.) using different marker types. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 3, p. 115-125, 1997.

PEIXOTO, A. R. **Plantas oleaginosas arbóreas**. São Paulo: Nobel, 1973. 282p.

PINHÃOMANSO. 2006. **A Planta: Pinhão Manso - *Jatropha curcas***. Disponível em: <<http://www.pinhaomanso.com.br/pinhaomanso.html>>. Acesso em: 25 abr. 2008.

PINTO, L. R. **Análise da estrutura genética das populações de milho (*Zea mays* L.) BR-105 e BR-106 e respectivos sintéticos IG-3 e IG-4 por meio de microssátelites**, Piracicaba, 2001. 142p. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, 2001.

PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, Bethesda, v. 155, n. 2, p. 945-959, 2000.

RAFALSKI, J. A.; VOGEL, J. M.; MORGANTE, M.; POWELL, W.; ANDRE, C.; TINGEY, S. V. Generating and using DNA markers in plants. In: BIRREN, B.; LAI, E. (Ed.). **Nonmammalian genome analysis: a practical guide**. San Diego: Academic Press, 1996. p. 75-134.

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). **Biomass and Bioenergy**, 2008. Disponível em: <http://www.science-direct.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6V22-4RHXTCW-_user=10&_rdoc=1&_fmt=&_orig=search&_sort=d&view=c&_acct=C000050221&_version=1&_urlVersion=0&_userid=10&md5=e65ac9bbb126487b690b0afb8dba78e5>. Acesso em: 27 abr. 2009.

REDDY, M. P.; SARLA, N.; REDDY, E. A. Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) polymorphism and application plant breeding. **Euphytica**, Dordrecht, v. 128, p. 9-17, 2002.

REDDY, K. D.; NAGARAJU, J.; ABRAHAM, E. G. Genetic characterization of the silkworm *Bombyx mori* by simple sequence repeat (SSR)-anchored PCR. **Heredity**, London, v. 83, p. 681-687, 1999.

RIBEIRO, J. **Adição de 5% de biodiesel no diesel passa a ser obrigatória em 2010**. G1, Brasília, 23 out. 2009. Disponível em: <http://g1.globo.com/Noticias/Economia_Negocios/0,,MUL1352301-9356,00.html>. Acesso em: 13 nov. 2009.

ROHLF, F. J. **Numerical taxonomy and multivariate analysis system**. Version 2.11. New York: Applied Biostatistics, 2000.

ROMANO, E.; BRASILEIRO, A. C. M. **Extração de DNA de plantas**. Disponível em: <<http://www.uefs.br/disciplinas/bot859/extra.pdf>>. Acesso em: 20 jul. 2007.

SAMPAIO, E.V.S. B. Overview of the Brazilian caatinga. In: S. H. Bullock, H. A. Mooney & E. Medina (Eds.). **SEASONALLY DRY TROPICAL FOREST**. Cambridge: University Press, 1995. p. 35-63.

SANTOS, S.; FERRIRA JUNIOR, E. J.; PIRES, B.; NETTO, A. P. da C. Efeito de diferentes adubações no desenvolvimento inicial de mudas de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PLANTAS OLEAGINOSAS, ÓLEOS, GORDURAS E BIODIESEL. 4., 2007, Varginha. **Anais...** Lavras: Ufla, 2007. v. 1, p. 547-554.

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

SATURNINO, H. M.; PACHECO, D. D.; GONÇALVES, N. P.; LOPES, H. F. Caracterização físico-química de alguns solos cultivados com pinhão manso no estado de Minas Gerais. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PLANTAS OLEAGINOSAS, ÓLEOS, GORDURAS E BIODIESEL, 2., 2005, Varginha. **Anais....** Lavras: UFLA, 2005b. v. 1, p. 103-107.

SCHLÖTTERER, C.; RITTER, R.; HARR, B.; BREM, G. High mutation rate of a long microsatellite allele in *Drosophila melanogaster* provides evidence for allele-specific mutation rates. **Molecular Biology and Evolution**, London, v. 15, n. 10, p. 1269-1274, 1998.

SCHLÖTTERER, C.; TAUTZ, D. Slippage synthesis of simple sequence DNA. **Nucleic Acids Research**, London, v. 20, n. 2, p. 211-215, 1992.

SCHNEIDER, S.; ROESSLI, D.; EXCOFFIER, L. **Arlequin ver. 2000**: a software for population data analysis. (software). Geneva: University of Geneva, Genetic and Biometry Laboratory, 2000. Disponível em: <<http://anthropologie.unige.ch/arlequin/>>. Acesso em: 10 abr. 2011.

SEBRAE AGRONEGÓCIOS. Europa é mercado potencial para o biodiesel 2007. Brasília: **Sebrae Agronegócios**, Brasília, n. 5, p. 17, 2007.

SEOANE, C. E. C.; SEBBENN, A. M.; KAGEYAMA, P.Y. Sistema de reprodução em populações de *Esenbeckia leiocarpa* Engl. **Revista do Instituto Florestal**, São Paulo, v. 13, n. 1, p. 19-26, 2001.

SHAFIE, M. S. B.; HASAN, S. M. Z.; SHAH, R. M. Study of genetic variability of Wormwood capillary (*Artemisia capillaris*) using inter simple sequence repeat (ISSR) in Pahang region, Malaysia. **Plant Omics Journal**, Lindfield, v. 2, n. 3, p. 127-134, 2009.

SHAO-CHUN, M.; ZHU-YING, L.; CONG, L. Application of biodiesel produced from *Jatropha curcas* L. seed oil. **Zhongguo Youzhi / China Oils and Fats**, Província de Shaanxiv, 32, n. 7, p. 40-42, 2007.

SILVA, S. G. A; ARRIEL, N. H. C.; SILVA, F. K. G.; DINIZ, A. L. Caracterização de acessos de germoplasma de pinhão manso da EMBRAPA Algodão, PB. In: CONGRESSE BRASILEIRO DE PLANTAS OLEAGINOSAS, ÓLEOS, GORDURAS E BIODIESEL, 5., 2008, Lavras. **Anais...** Lavras: Ufla, 2008. v. 1, p. 1045-1051.

SILVA, D. J. H.; MOURA, M. C. C. L.; CASALI, V. W. D. Recursos genéticos do banco de germoplasma de hortaliças da UFV: Histórico e expedições de coleta. **Horticultura Brasileira**, Campinas, v. 19, n. 2, p. 108-114, 2001.

SIGRIST, M. S. **Divergência genética em *Curcuma longa* L. utilizando marcadores microssatélites e agromorfológicos**. 2009. 82 p. Dissertação (Mestrado em Área de Genética, Melhoramento Vegetal e Biotecnologia) – Instituto Agronômico, Campinas, 2009.

SIRISOMBOON, P.; KITCHAIYA, P.; T. PHOLPHO, T.; MAHUTTANYAVANITCH, W. Physical and mechanical properties of *Jatropha curcas* L. fruits, nuts and kernels. **Biosystems and Engineering**, London, v. 97. p. 201-207, 2007.

SLATKIN, M. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. **Genetics**, Bethesda, v. 130, p. 457-462, 1995.

SOLOMON RAJU, A. J.; EZRADANAM, V. Pollination ecology and fruiting behaviour in a monoecious species, *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae). **Current Science**, Bangalore, v. 83, n. 11, p. 1395-1398, 2002.

SOUZA, A. P. Biologia molecular aplicada ao melhoramento. In: NASS, L. L., VALOIS, A. C. C., MELO, I. S., VALADARES-INGLIS, M.C. (Ed.). **Recursos genéticos & melhoramento: plantas**, Rondonópolis: Fundação M.T., p. 939-966, 2001.

STRAND, M.; PROLLA, T. A.; LISKAY, R. M.; PETES, T. D. Destabilization of tracts of simple repetitive DNA in yeast by mutations affecting DNA mismatch repair. **Nature**, London, v. 365, p. 274-276, 1993.

SUDHEER, D. V. N. P.; PANDYA, N.; REDDY, M. P.; RADHAKRISHNAN, T. Comparative study of interspecific genetic divergence and phylogenetic analysis of genus *Jatropha* by RAPD and AFLP. **Molecular Biology Reports**, Dordrecht, v. 36, p. 901-907, 2008.

SUGANUMA, E.; CIAMPI, A. Y. **Análise genética populacional de jatobá (*Hymenaea* ssp *Leguminosae*) utilizando microssatélites**. S.L.: Redbio, 2001. 148 p.

SUN, Q.-B.; LI, L.-F.; LI, Y.; WU, G.-J.; GE, X.-J. SSR and AFLP markers reveal low genetic diversity in the biofuel plant *Jatropha curcas* in China. **Crop Science**, Madison, v. 48, p. 1865-1871, 2008.

TAPANES, N. O.; ARANDA, D. A. G.; CARNEIRO, J. W. M. **Transesterificação dos glicerídeos do óleo de *Jatropha curcas* L.: estudo teórico**. Disponível em: <<http://www.biodiesel.gov.br/docs/congresso2006/producao/Glice27.pdf>>. Acesso em: 23 ago. 2008.

TATIKONDA, L.; WANI, S. P.; KANNAN, S.; BEERELLI, B.; SREEDEVI, T. K.; HOISINGTON, D. A.; DEVI, P.; VARSHNEY, R. K. AFLP-based molecular characterization of an elite germplasm collection of *Jatropha curcas* L., a biofuel plant. **Plant Science**, Clare, v. 176, n. 4, p. 505-513, 2009.

TAUTZ, D.; RENZ, M. Simple sequences are ubiquitous repetitive componets of eukaryotic genomes. **Nucleic Acids Research**, London, v. 12, n. 10, p. 4127-4138, 1984.

TEIXEIRA, J. P. F. Teor e composição do óleo de sementes de *Jatropha* spp. **Bragantia**, Campinas, v. 46, n. 1, p. 151-157, 1987.

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

THE TAXONOMICON. **Taxon**: *Jatropha curcas*. Disponível em: <<http://taxonomicon.taxonomy.nl/TaxonTree.aspx>>. Acesso em: 25 abr. 2008.

THOMPSON, J. D.; PLEWNIAK, F.; POCH, O. A comprehensive comparison of multiple sequence alignment programs. **Nucleic Acids Research**, London, v. 27, n. 13 p. 2682-2690, 1999.

TOTH, G.; GASPARI, Z.; JURKA, J. Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. **Genome Research**, New York, p. 967-981, 2000.

TSUMURA, Y.; OHBA, K.; STRAUSS, S. H. Diversity and inheritance of inter-simple sequence repeat polymorphisms in Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugi (*Cryptomeria japonica*). **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 92, p. 40-45, 1996.

VENCOVSKY, R. Análise de variância de frequências alélicas. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 15, p. 53-60, 1992.

WEBSTER, G. L. Euphorbiaceae. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, Saint Louis, v. 81, p. 1-144, 1994.

WEIR, B. S. **Genetics data analysis II**: methods for discrete population genetic data. Suderland, MA: Sinauer Associates, 1996. 455p.

WEN, M.; WANG, H.; XIA, Z.; ZOU, M.; LU, C.; WANG, W. Development of EST-SSR and genomic-SSR markers to assess genetic diversity in *Jatropha Curcas* L. **BMC Research Notes**, London, v. 3, n. 4, 2010.

WOLFE, A. D. ISSR techniques for evolutionary biology. **Methods in Enzimology**, Pasadena, v. 395, p. 134-144, 2005.

WOLFE, A. D.; LISTON, A. Contributions of PCR-based methods to plant systematics and evolutionary biology. In: SOLTIS, P.S.; SOLTIS, D.E.; DOYLE, J.J. (Ed.). **Molecular Systematics of Plants: DNA Sequencing**. New York: Kluwer, 1998. p. 43-86.

WOLFE, A. D.; XIANG, Q. Y.; KEPHARTE, S. R. Accessing hybridization in natural populations of *Penstemon* (Scrophulariaceae) using hypervariable intersimple sequence repeats (ISSR) bands. **Molecular Ecology**, Malden, v. 7, p.1107-1125, 1998.

WOLFF, K.; ZIETKIEWICZ, E.; HOFSTRA, H. Identification of chrysanthemum cultivars and stability of DNA fingerprint patterns. **Theoretical Applied Genetics**, Berlin, v. 91, p. 439-447, 1995.

WRIGHT, S. The interpretation of population structure by F-statistic with special regard to systems of mating. **Evolution**, Malden, v. 19, p. 395-420, 1965.

YADAV, H. K.; RANJAN, A.; ASIF, M. H.; MANTRI, S.; SAWANT, S. V.; TULI, R. EST-derived SSR markers in *Jatropha curcas* L.: development, characterization, polymorphism, and transferability across the species/genera. **Tree Genetics & Genomes**, Heidelberg, v. 7, n. 1, p. 207-219, 2010.

YEH, F. C.; YANG, R. C.; BOYLE, T. B. J.; YE, Z. H.; MAO, J. X. **POPGENE, the user-friendly shareware for population genetic analysis molecular biology and biotechnology centre**. Edmonton: University of Alberta, 2000. Disponível em: <<http://www.ualberta.ca/~fyeh/>>. Acesso em: 15 mar 2011.

YEH, F. C.; CHONG, D. K. X.; YANG, R. C. RAPD variation within and among natural populations of trembling aspen (*Populus tremuloides* Michx.) from Alberta. **Journal Heredity**, London, v. 86, p. 45-46, 1995.

ZANE, L.; BARGRILLONI, L.; PATARNELLO, T. Strategies for microsatellites isolation: a review. **Molecular Ecology**, Malden, v. 11, p. 1-6, 2002.

ZHOU, H.; LU, H.; LIANG, B. Solubility of Multicomponent Systems in the Biodiesel Production by Transesterification of *Jatropha curcas* L. Oil with Methanol. **Journal of Chemical and Engineering Data**, Washington, v. 51, p. 1130-1135, 2006.

ZIETKIEWICZ, E.; RAFALSKI, A.; LABUDA, D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. **Genomics**, San Diego, v. 20, p. 176-183, 1994.

ZIPCODEZOO. *Jatropha curcas*. Disponível em: <http://zipcodezoo.com/Plants/J/Jatropha_curcas.asp>. Acesso em: 24 abr. 2008.

ANEXOS

ANEXO A

Arquivo de entrada do programa Arlequin

[Profile]

Title = "AMOVA–pinhão-manso-J.curcas-Dados obtidos por Nucci, 2011"

NbSamples= 2

DataType= ISSR

GenotypicData= 0

LocusSeparator= NONE

[Data]

[[Samples]]

SampleName= "pop01"

SampleSize= 12

SampleData= {

01 1

010010101000000101010100101001000101010101101111010000101010000000010101010001000000100010010010111010010010010001100010010010100100000010010101001000000000

000000100010000100011000011100111101100101001011

02 1

1001111100000001010101001010010001010101011011110100001010100000000101010100010000000100010100101110100100100000000100000100001000000010010101001000000000

000000010010000100011000011100111101100101001011

03 1

000000101000000101010100101001000101010101101111010000101010000000010101010001000000100010010010111010010010010001100010010010100100000010010101001001000000

000000010010000100011000011100111101100101001011

04 1

10000101110000000010010010100010000????????????00100111010000000000001000111110000000010100101101001000010000000100001001100000000001000010100010000000000100

000000000100010001100000011000101101110001000000

05 1

00100001010000010101010010100100010101010110111101000010101000000001010110000100000001000001001011101001001000100000101001011101000000001001101001000100000

000000001001000100001100011100111101100101001011

06 1

1000010111000000000000100100010100????????????000000101000000000000010011000000????????1001010010????????0000000001000000000000????????????111011111100

00000010001000110000001100000000001001000000

07 1

10000101110000000010010010100010000????????????00010111010000000000001000111100????????1011010000????????01000010000000000000000010001001000100000001000000

0000000100010001100000001100000010010001000000

08 1

????????????101010100101001000101010101101111010000101010000000001111000010000000100000100100110010010010000100000100000000000000000010011101001000010000

00000000000001000000010001100111101100101001011

09 1

001000001010000101010100101001000101010101101111010000101010000000001011000010????????0100100110010010010000100000100010010000000000100101010010000001010

00000000101000100001100011100111101100101001011


```

24 1
10110100111000000010010110100010011????????????0000000000100000000000011110000????????????1001010110????????????????????????????????????????00001001110010
0000010001000110000001100000000001100100111
25 1
100011001110011101000100101001000101010101100111010000100100000000100010111000100000110000110010101110100010010010001100001010010010000001001010100100100001
000000001001000100001100011100111101100101001011
26 1
00000000001111010100010010100100010101010110011001000000110110010000101111101000000011000010010101110000100000000000010000010000000000000001000000000010
0100000000000000000000010111100111101100000010010
27 1
00111101111010110100010010100100010101010110011100101010010110010100111111101101010110000110010101110010001001000000010010101010000000010010100000100100000
010000001001000100001110011100111101100101001011
28 1
001111011110101101000100101001000101010101100110010100001001100000001101111000010000100001100101011000001000000010000010000011010110000000000001000000001000
111100000100100010001101011100111101100101001011
29 1
101111011110111011001100010100100101010101100110100011110001100000001101110000100010000000100101011000001000000001000000000000000001001010100100010000
0000000000000100010000111001000000000000010100101
}

```

```
[[Structure]]
```

```
StructureName= "Populações"
```

```
NbGroups= 1
```

```
IndividualLevel= 0
```

```
Group={
```

```
"pop01"
```

```
"pop02"
```

```
}
```

ANEXO B

Arquivo de entrada do programa Genepop

```
/* Diploid ISSR Data Set */
```

Number of populations = 2

Number of loci = 209

Locus name :

500 530 600 680 730 800 850 950 1000 1100 1200 1400 1500 1900 2000 380 390 400 410 480 490 500 510 540 600 620 700 710 720 790 800 820 850 900 1000 300 325 350 375 400 425 480 500 600
700 725 800 850 1000 580 600 680 700 750 800 900 1000 1100 1200 1300 2000 280 320 360 380 390 400 420 440 460 480 500 580 600 650 700 800 900 1000 1200 1400 1450 600 700 900 1000 1200
1400 1500 1600 1800 2000 2200 420 440 500 580 600 700 720 1200 1300 1400 710 750 800 850 950 1000 1100 1800 1900 2000 430 460 480 500 530 580 600 650 700 720 780 800 850 900 950 1000
1100 1250 1300 1400 1500 1700 380 390 400 410 550 600 620 700 750 800 850 900 1000 1100 1300 1500 1600 500 590 620 700 750 790 800 900 1000 1100 1300 1400 1500 1600 2000 2050 2100
2200 480 500 520 550 600 700 750 800 900 950 1000 1050 1200 1300 1400 1900 350 400 450 490 500 600 650 700 800 900 950 1000 280 300 350 380 500 550 600 800 900 1000 1400

```
name = CPQBA
```

fis = 0.0

[illegible]

name = UFS

fis = 0.0

```

10010101111000000000000000000000.....00100000000000000.....110001111011.....
000111011011101101010001001010010001010101011001110100101001011000010010111010110000011000011001010111010001001000110011000001010000000010010101000100100001
1100000010001001000011100111001111101100101001011
000000010100000101000100101001000101010101100110101010010100000001001011101011000000100001100101011100100100100100000001011100101100000010001010100100000101
11010000001001000100011100111001111101100101001011

```


ANEXO D

Matriz de similaridade de Jaccard baseada em maracadores ISSR (identificação dos acessos ver Tabela 8)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29
1	1																												
2	0,73	1,00																											
3	0,94	0,74	1,00																										
4	0,23	0,27	0,23	1,00																									
5	0,65	0,69	0,66	0,23	1,00																								
6	0,14	0,16	0,15	0,40	0,15	1,00																							
7	0,15	0,18	0,15	0,57	0,12	0,33	1,00																						
8	0,57	0,63	0,56	0,26	0,64	0,16	0,14	1,00																					
9	0,70	0,66	0,71	0,21	0,71	0,14	0,13	0,69	1,00																				
10	0,25	0,29	0,25	0,31	0,25	0,42	0,28	0,24	0,22	1,00																			
11	0,22	0,24	0,21	0,41	0,23	0,30	0,28	0,24	0,21	0,24	1,00																		
12	0,04	0,04	0,04	0,18	0,04	0,27	0,33	0,04	0,04	0,50	0,20	1,00																	
13	0,31	0,43	0,32	0,55	0,41	0,29	0,25	0,42	0,34	0,17	0,43	0,00	1,00																
14	0,50	0,46	0,50	0,25	0,45	0,20	0,20	0,45	0,51	0,25	0,30	0,04	0,44	1,00															
15	0,36	0,38	0,36	0,25	0,43	0,22	0,19	0,41	0,41	0,26	0,30	0,04	0,33	0,57	1,00														
16	0,25	0,27	0,25	0,20	0,28	0,22	0,20	0,32	0,27	0,20	0,20	0,06	0,26	0,31	0,30	1,00													
17	0,27	0,29	0,26	0,22	0,28	0,22	0,26	0,28	0,25	0,28	0,35	0,13	0,30	0,31	0,27	0,50	1,00												
18	0,36	0,35	0,36	0,26	0,37	0,19	0,17	0,43	0,40	0,23	0,29	0,04	0,34	0,50	0,53	0,36	0,30	1,00											
19	0,41	0,44	0,40	0,31	0,40	0,18	0,23	0,45	0,43	0,20	0,34	0,04	0,48	0,58	0,49	0,43	0,41	0,53	1,00										
20	0,25	0,27	0,26	0,24	0,28	0,16	0,14	0,29	0,26	0,15	0,39	0,04	0,54	0,27	0,29	0,34	0,39	0,33	0,32	1,00									
21	0,47	0,47	0,46	0,29	0,51	0,19	0,19	0,58	0,49	0,32	0,28	0,04	0,48	0,63	0,51	0,35	0,36	0,57	0,60	0,34	1,00								
22	0,49	0,50	0,49	0,25	0,50	0,26	0,21	0,44	0,53	0,33	0,29	0,04	0,47	0,60	0,47	0,30	0,31	0,48	0,56	0,31	0,64	1,00							
23	0,30	0,33	0,30	0,39	0,30	0,28	0,28	0,33	0,31	0,48	0,31	0,24	0,45	0,36	0,32	0,25	0,31	0,33	0,43	0,32	0,47	0,41	1,00						
24	0,21	0,24	0,22	0,28	0,24	0,34	0,31	0,23	0,29	0,37	0,29	0,38	0,23	0,34	0,31	0,30	0,34	0,29	0,34	0,22	0,36	0,37	0,48	1,00					
25	0,41	0,45	0,40	0,27	0,50	0,20	0,19	0,49	0,46	0,28	0,27	0,04	0,48	0,59	0,56	0,30	0,27	0,44	0,51	0,27	0,59	0,56	0,36	0,37	1,00				
26	0,36	0,37	0,36	0,27	0,39	0,15	0,17	0,46	0,41	0,17	0,29	0,04	0,31	0,52	0,43	0,40	0,27	0,60	0,54	0,31	0,51	0,44	0,32	0,27	0,41	1,00			
27	0,42	0,46	0,41	0,26	0,51	0,20	0,22	0,42	0,48	0,27	0,29	0,04	0,50	0,70	0,58	0,36	0,34	0,56	0,64	0,34	0,62	0,59	0,36	0,37	0,57	0,49	1,00		
28	0,41	0,41	0,40	0,26	0,42	0,21	0,20	0,46	0,49	0,25	0,30	0,04	0,41	0,58	0,49	0,33	0,31	0,47	0,52	0,27	0,54	0,49	0,34	0,36	0,45	0,53	0,55	1,00	
29	0,17	0,22	0,17	0,21	0,21	0,22	0,20	0,32	0,22	0,24	0,32	0,21	0,27	0,30	0,29	0,35	0,49	0,34	0,40	0,24	0,39	0,29	0,32	0,31	0,34	0,31	0,34	0,36	1,00

ANEXO E

Programa de entrada do Structure

[illegible]

[illegible]