UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

MARIANA LETÍCIA COSTA REDONDO

Caracterização molecular por AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) de acessos de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.)

Piracicaba
2011

MARIANA LETÍCIA COSTA REDONDO

Caracterização molecular por AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) de acessos de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.)

Dissertação apresentada ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente

Orientadora: Profa. Dra. Siu Mui Tsai

Piracicaba

2011

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Redondo, Mariana Letícia Costa

Caracterização molecular por AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) / Mariana Letícia Costa Redondo; orientadora Siu Mui Tsai. - - Piracicaba, 2011.
90 p.: il.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

1. Análise multivariada 2. Biologia molecular 3. Diversidade genética 4. Euphorbiaceae 5. Marcador molecular 6. Microscopia eletrônica de varredura 7. Morfologia vegetal 8. Reação em cadeia por polimerase I. Título

CDU 575:581.145.1

“O valor das coisas não está no tempo em que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis” (Fernando Pessoa).

A minha família, pelo apoio incondicional no percurso deste trabalho, por sempre me apoiarem em cada conquista, e sucesso alcançado neste período e por entenderem o quanto é importante a realização deste trabalho para mim.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela constante presença e pela força e amparo em todos os momentos de minha vida;

A minha família, principalmente aos meus pais, Airton e Iraci, a minha irmã Ana Carolina, que sempre representaram um porto seguro para os momentos de tempestade, incentivando-me com bons conselhos e ouvindo-me nos momentos difíceis e participando de minhas alegrias. Também agradeço aos meus familiares que sempre me incentivaram para a realização deste projeto

A Profa Dra Siu Mui Tsai (CENA/USP), pela grande oportunidade de poder desenvolver esse projeto, pela orientação, confiança, amizade sincera e por constantemente estar presente de forma solícita durante o desenvolvimento do trabalho;

A Profa Dra Adriana Pinheiro Martinelli (CENA/USP) pelo auxilio e sugestões no desenvolvimento da morfologia floral deste trabalho, e sobretudo pela atenção e amizade.

Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP), em especial ao Laboratório de Biologia Celular e Molecular, pela oportunidade de realização do curso de mestrado;

Aos técnicos do Laboratório de Biologia Celular e Molecular do CENA, Fábio Duarte, Francisco Montrazzi, José Elias Gomes, Ludmila Campos, Wagner Picinini e demais funcionários que trabalham no CENA pela ajuda cotidiana e amizade;

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de mestrado (Processo N° 08/56134-7);

A Empresa Biocapital e Participações SA por estar presente em todas as etapas do meu trabalho, auxiliando-me na coleta dos acessos de Alvinlândia, Jales e Lins, e cedendo as sementes referentes aos acessos comerciais de Mato Grosso do Sul e Minas Gerais. Gostaria de agradecer ao Sr. Maurício Nogueira, Srta. Carolina Bianchi, e aos Srs. Diogo Togni e Thiago Souza por me ajudarem e me darem o suporte que necessitava para o andamento desse trabalho, tanto na coleta de flores de sementes e estacas;

Ao Instituto Agronômico de Campinas (IAC), que através dos pesquisadores Dra. Daniela de Argolo Marques, e Dr. Carlos Augusto Colombo, que gentilmente cederam os acessos do México, China e Costa Rica, que foram estudados neste trabalho;

Ao Núcleo de Apoio à Pesquisa/Microscopia Eletrônica na Pesquisa Agropecuária - NAP/MEPA (ESALQ/USP) na pessoa do Prof. Dr. Elliot Kitajima pela utilização dos Microscópios eletrônicos de Varredura e Transmissão nas análises morfológicas;

A Profa. Dra. Neuza de Lima Nogueira pela sua amizade, compreensão e incentivo na realização do trabalho;

Ao Prof. Dr. Marcílio de Almeida, por contribuir na identificação anatômica dos órgãos florais, com gentileza e atenção;

A técnica do Laboratório de Histopatologia Vegetal Mônica Lanzoni Rossi, por sua amizade, carinho e a sua presteza em me ajudar nas análises microscópicas e também na obtenção das imagens;

Ao meu amigo Enéas Ricardo Konzen, pela amizade, companheirismo, incentivo, ajuda, dedicação e colaboração;

Aos amigos e colegas do Laboratório de Biologia Celular e Molecular do CENA/USP, Acácio, Aline, Ana, Beatriz, Clovis, Danielle, Felipe, Fabiana, Gustavo, Lucas, Maju, Milena, que sempre estiveram ao meu lado para me distrair, me animar e me incentivar no decorrer destes anos. E também agradeço aos amigos e colegas do laboratório de Histopatologia Vegetal, Thalita, Hilo, Renan, Raquel e Rafael, pelo companheirismo, e pela colaboração na formatação das imagens e nas análises dos experimentos;

As Secretarias da Pós-Graduação do CENA: Neuda, Alzira, Claudia e Sônia pela paciência, presteza e simpatia;

A todos que sem saberem, me proporcionaram alegria por um simples sorriso, abraço, cumprimento ou frase de incentivo.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Variabilidade fenotípica do pinhão manso em vários países onde ele é cultivado. 19

Tabela 2 - Primers testados para as amplificações das reações de RAPD 32

Tabela 3 - Sequências dos adaptadores, *primers* da pré-amplificação e amplificação seletiva para as reações de AFLP 33

Tabela 4 - Resultados referentes aos marcadores moleculares RAPD, RAPD-RFLP e AFLP 38

Tabela 5 - Porcentagem de locos polimórficos (P%), índice de diversidade gênica de Nei (H) e índice de Shannon (I), em acessos de pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.), analisados por marcadores AFLP 44

Tabela 6 - Dados obtidos através da medida da exina de 25 grãos de pólen de *Jatropha curcas* L., através de microscopia eletrônica de transmissão 65

Tabela 7 - Porcentagem de viabilidade dos grãos de pólen de pinhão manso em diferentes corantes 68

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Países onde o pinhão manso se encontra de maneira cultivada e não cultivada, e observação da rota de domesticação da planta 14

Figura 2 - Perfil de RAPD obtido para quatro amostras de pinhão manso, das seguintes procedências em ordem; China, México, Costa Rica e doze amostras de Alvinlândia coletadas no estado de São Paulo (Brasil) 36

Figura 3 - Perfis eletroforéticos de fragmentos RADP-RFLP amplificados com as enzimas A - TaqI/EcoRI e B - HindIII/ApaI mostrando na ordem de cada gel: o marcador de peso molecular 1kb, seguido pelas amostras da China, México, Costa Rica, e mais doze acessos referentes a Alvinlândia 39

Figura 4 - Perfil eletroforético de fragmentos AFLP: A – Marcador molecular 100 pb; B – amplificação com os pares de *primers* AAA-CGC com as amostras na seguinte ordem: Costa Rica, México, China e cinco amostras referentes a Alvinlândia; C – amplificação com os *primers* AGC-CAC com as amostras seguindo a mesma sequência anteriormente citada; D - amplificação com os *primers* ACG-CA seguindo a mesma ordem das amostras; e E – marcador molecular 100pb 40

Figura 5 - Dendrograma elaborado através do método UPGMA (*Unweighted Pair-Group With Arithimethic Averages*) de seis acessos de pinhão-manso, analisados através de marcadores AFLP 41

Figura 6 - Perfil eletroforético de fragmentos AFLP amplificados com os *primers* EcoRI-A e MseI-AC em seis acessos de pinhão-manso (*Jathropha curcas* L.). 45

Figura 7 - Dendrograma elaborado através do método UPGMA (*Unweighted Pair-Group With Arithimethic Averages*) de seis acessos de pinhão-manso 46

Figura 8 - Fotos tiradas de pinhão manso no campo experimental de Jales, Charqueada e na estufa do laboratório de Biologia Celular e Molecular 70

Figura 9 - Aspectos da morfologia floral de *Jatropha curcas* L., através de MEV, esteriomicroscópio e MO 71

Figura 10 - Aspectos do grão de pólen MEV, MET e MO 73

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 13

2. REVISÃO DE LITERATURA 16

3. OBJETIVOS 21

4. MARCADORES MOLECULARES AFLP NA CARACTERIZAÇÃO DE ACESSOS DE PINHÃO MANSO 22

RESUMO 22

ABSTRACT 23

4.1. INTRODUÇÃO 24

4.2. REVISÃO DE LITERATURA 26

4.2.1. MARCADORES RAPD E RAPD-RFLP 26

4.2.2. MARCADORES AFLP 27

4.3. MATERIAIS E MÉTODOS 30

4.3.1. MATERIAL VEGETAL 30

4.3.2. EXTRAÇÃO DE DNA 30

4.3.3. POTENCIALIDADES DAS TÉCNICAS DE RAPD, RAPD-RFLP E AFLP NA DETECÇÃO DE POLIMORFISMOS 31

4.3.4. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR POR AFLP DE SEIS ACESSOS BRASILEIROS 33

4.4. RESULTADOS E DISCUSSÕES 35

4.4.1. POTENCIALIDADE DAS TÉCNICAS DE RAPD, RAPD-RFLP E AFLP NA DISTINÇÃO DE ACESSOS DE PINHÃO MANSO 35

4.4.2. ANÁLISE DA DIVERGÊNCIA GENÉTICA DE ACESSOS DE PINHÃO MANSO BRASILEIROS POR AFLP 43

4.5. CONCLUSÕES 50

5. MORFOLOGIA E ANATOMIA FLORAL DO PINHÃO MANSO (*Jatropha curcas* L.) EUPHORBIACEAE 51

RESUMO 51

ABSTRACT 52

5.1. INTRODUÇÃO 53

5.2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 54

5.2.1. MORFOLOGIA FLORAL DE JATROPHA CURCAS L. 54

5.2.2. VIABILIDADE POLÍNICA 56

5.3. MATERIAIS E MÉTODOS 57

5.3.1. MORFOLOGIA E ANATOMIA DOS ÓRGÃOS FLORAIS 57

5.3.2. VIABILIDADE POLÍNICA 59

5.4. RESULTADOS E DISCUSSÕES 60

5.4.1. MORFOLOGIA E ANATOMIA DOS ÓRGÃOS FLORAIS 60

5.4.2. TESTE DE VIABILIDADE POLÍNICA ATRAVÉS DE QUATRO CORANTES 66

5.5. CONCLUSÕES 74

6. REFERÊNCIAS 75

RESUMO

REDONDO, M. L. C. **Caracterização molecular por AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) de acessos de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.)**. 2011. 90 p. Dissertação (Mestrado) - Centro de Energia Nuclear, Agricultura da Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

O pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) é uma planta versátil e com diversos usos potenciais em especial para produção de biodiesel. O óleo obtido de suas sementes é seu produto mais rentável e atualmente desperta grande interesse econômico em diversos setores. A caracterização molecular e a avaliação do potencial reprodutivo dos acessos de pinhão-manso são aspectos ainda pouco abordados no Brasil, sendo necessária a caracterização de acessos brasileiros e suas potencialidades. Os objetivos do presente trabalho foram analisar a diversidade genética e a divergência genética em acessos comerciais de pinhão-manso, coletados no estado de São Paulo (Alvinlândia, Lins, Itatinga e Jales), Minas Gerais (Janaúba) e Mato Grosso do Sul (Dourados). Primeiramente, foram comparadas as técnicas de RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), RAPD-RFLP (*Restrinction Fragment Length Polymorphism* a partir do RAPD) e AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), quanto à potencialidade de detectar polimorfismos dentro dos acessos e entre os acessos. Posteriormente, os acessos foram caracterizados através de AFLP. Além disso, este trabalho visou detectar se há diferença nas estruturas e no desenvolvimento floral e na taxa de viabilidade polínica dos acessos de São Paulo (Alvinlândia), Minas Gerais e Mato Grosso do Sul. Nessa parte do estudo, foram analisadas e identificadas as estruturas dos órgãos florais e do grão de pólen através das técnicas de microscopia de luz, eletrônica de varredura e transmissão. Na comparação entre as técnicas moleculares, apenas AFLP permitiu a detecção de polimorfismos, com base em um acesso escolhido para os testes (Alvinlândia, SP). As análises de todos acessos através de AFLP mostraram considerável polimorfismo, que foi refletido nas estimativas de diversidade genética de Nei e Índice de Shannon. Na análise de agrupamento, as amostras de cada acesso foram agrupadas coerentemente. Os acessos de Dourados e de Itatinga formaram um grupo separado, apresentando cerca de 76% de similaridade com o segundo grupo (Alvinlândia, Jales, Lins, Janaúba). Dentro deste último, os acessos de São Paulo ficaram agrupados (com cerca de 84% de similaridade), enquanto que Janaúba mostrou-se separado, com 82% de similaridade genética. Estes resultados indicam que os acessos de São Paulo provavelmente tenham origem a partir de Janaúba. No entanto, Itatinga provavelmente tenha origem a partir de Dourados. Quanto à morfologia floral, não foi observada nenhuma diferença a nível microscópico na formação e nas estruturas dos órgãos florais. Quando comparada a viabilidade polínica entre os dois acessos coletados em campo (Minas Gerais e Mato Grosso do Sul), notou-se que há diferença significativa na taxa de viabilidade, mesmo os valores sendo muito próximos (Mato Grosso do Sul - 81,91% e Minas Gerais - 77,20%), mostra que tanto os acessos de Minas Gerais como os de Mato Grosso do Sul podem ser utilizados como parentais masculinos em programas de melhoramento genético. A divergência genética moderada e a baixa variabilidade morfológica sugerem que coletas de materiais em poucos locais poderiam representar a diversidade genética da espécie. Estudos mais aprofundados, empregando técnicas como de microssatélites e mais acessos, são

necessários para o conhecimento da diversidade e estrutura genética do pinhão-manso no Brasil.

Palavras-chave: diversidade genética, divergência genética, RAPD, RAPD-RFLP, microscopia,AFLP

ABSTRACT

REDONDO, M. L. C. Molecular Characterization by AFLP **(Amplified Fragment Length Polymorphism) in accessions of physic nut (*Jatropha curcas* L.)**. 2011. 90 p. Dissertação (Mestrado) - Centro de Energia Nuclear, Agricultura da Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

Physic nut (*Jatropha curcas* L) is a very versatile plant with several potential uses especially for the production of biodiesel. The oil obtained from its seeds is the most profitable product of this specie and it is currently attracting great interest in various economic sectors. Molecular characterization and evaluation of reproductive potential of the accessions of pysic nut have still little attention in Brazil, it still need the characterization of Brazilian accessions and its potenciality. The ains of this study were: to analyze the genetic diversity and genetic divergence in commercial accessions of physic nut, from the States of São Paulo (Alvinlândia, Lins, Jales and Itatinga), Minas Gerais (Janaúba)and Mato Grosso do Sul (Dourados). Firstly we compared the RAPD (*Random Amplified Polymorphic* DNA) RAPD-RFLP (*Fragment Length Polymorphism Restriction from* RAPD) and AFLP (*Amplified Fragment Length* Polymprphism) regarding the potencial to detect polymorphism within the accessions and among accessions. Subsequently, the accessions were characterized by AFLP. Moreover this work aimed to detect whether there are differenced on flower structures and development and the rate of pollen viability on the accessions of São Paulo (Alvinlândia), Minas Gerias and Mato Grosso do Sul. On this part of the study were analysed and identified the structures of the floral organs and pollen grain through the techniques of, light microscopy, scanning electron and transmission microscopy. Comparing the molecular techniques, only AFLP allowed the detection of polymorphisms based on the accession chosen for testing (Alvinlândia, SP). Analyses of all accesses by AFLP showed considerable polymorphism, wich was reflected in estimates of genetic diversity index of Nei and Shannon. In cluster analysis, samples of each accessions were grouped consistently. The accessions of Dourados and Itatinga formed a separated group, with approximately 76% similarity with the second group (Alvinlândia, Jales, Lins, Janaúba). Within the last, accessions of São Paulo werte grouped (about 84% similarity), while Janaúba showed p separately, with 82% of genetic similarity. These results indicates that the accessions of São Paulo probably originates from Janaúba. However Itatinga probably originates from Dourados. As floral morphology, we observed no difference at microscope level on the formation and on the structures of floral organs. When compared the pollen grain viability between the two accessions collected in the field (Minas Gerais and Mato Grosso do Sul), it was noted that the viability rated were significantly different, even though the values being very close (Mato Grosso do Sul – Minas Gerais 81,91% - 77,20%), shows that both the accessions of Minas Gerais as the Mato Grosso do Sul can be used as male parental in breeding programs. The moderate and low genetic divergence suggests that morphological variability collections of materials in a few locations could represent the genetis diversity of the species. Further studies employing techniques such as microsatellite and more accessions are required for an understanding of diversity and genetic structure of physic nut in Brazil.

Keywords: Genetic Diversity, Genetic Divergence, RAPD, RAPD-RFLP, microscopy, AFLP

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Jatropha* (*Euphorbiaceae*) tem 172 espécies, do qual *Jatropha curcas* L, também conhecido como, physic nut, purging nut (Inglês); pourghère, pignon d'Inde (Francês); purgeernoot (Holandês); purgueira (Português); fagiola d´India (Italiano); dand barrî, habel meluk (Árabe); kanananaeranda, parvataranda (sânscrito); bagdherenda, jangliarandi, safed arand (Hindi); kadam (Nepal); yu-lu-tsu (chinês); sabudan (Tailândia); túbang – Bákod (Filipinas); jarak budeg (Indonésia); bagani (Costa do Marfim); kpoti (Togo); tabanani (Senegal); mupuluka (Angola); butuje (Nigéria); makaen (Tanzânia); piñoncillo (México); Coquillo, tempate (Costa Rica); tártaro (Porto Rico); mundubi-assu pinhão-manso (Brasil); piñol (Peru) e pinón (Guatemala) (HELLER, 1996; SCHULTZE-MOTEL, 1986). É uma espécie de origem tropical, adaptada a altas temperaturas e a clima seco, e é reconhecida como a forma mais primitiva, da qual as outras espécies de *Jatropha* evoluíram com mudanças no hábito de crescimento e estruturas das flores (MC VAUGH, 1945; DEGHAN; WEBSTER, 1979).

Acredita-se que sua origem tenha ocorrido nas Américas Central e do Sul, tendo seu cultivo sido expandido para vários países do mundo. *J. curcas* é nativa da América tropical, mas agora é encontrada em abundância em muitas regiões tropicais e sub-tropicais como na África e na Ásia. Isto se deve pela provável distribuição por vários navios portugueses através das ilhas de Cabo Verde e Guiné Bissau (HELLER, 1996). Os países onde foi implantada são: Zimbabue, China, Índia, Ilhas Maurício e Filipinas. É estimado que exista entre 500.000 a 600.000 ha de pinhão manso cultivado em toda a Índia e 2 milhões de hectares cultivados na China (FAIRLESS, 2007).

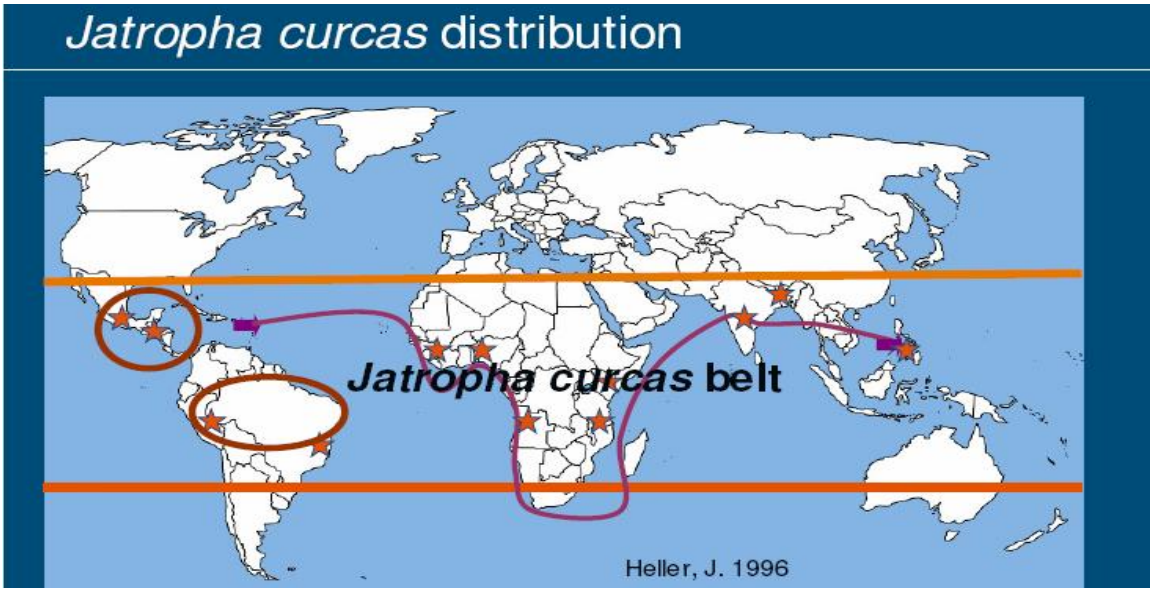


Figura 1 - Países onde o pinhão manso se encontra de maneira cultivada e não cultivada e observação da rota de domesticação da espécie

Diversos estudos buscaram entender a origem da planta, mas a fonte ainda permanece controversa. Martin & Mayeux (1985) identificaram o Estado do Ceará no Brasil como sendo o Centro de Origem, sem dar qualquer argumento. Deghan & Webster (1979) dizem ser sem dúvida parte da flora do México e provavelmente seu local de origem.

No Brasil, a espécie é encontrada de forma dispersa adaptando-se a condições edafoclimáticas variadas, ocorrendo nas regiões sudeste, centro-oeste e nordeste. Caracteriza-se por ser um arbusto que pode atingir até 5 m de altura. A planta é decídua, apresentando folhas com pecíolo grande e esverdeado; o caule é liso e cilíndrico. A espécie é alógama, apresentando inflorescências do tipo cimera definida. A planta é monóica, sendo que as flores masculinas e femininas estão presentes em uma mesma inflorescência. O fruto é carnoso do tipo cápsula trilocular, possuindo três sementes (SATURNINO, 2005). O ciclo de vida da espécie é bastante prolongado, podendo chegar até 40 anos. A planta é tolerante ao estresse hídrico e apresenta grande potencial ecológico na recuperação de áreas degradadas (TEIXEIRA, 2005).

Atualmente, o pinhão manso pode ser considerado uma planta oleaginosa de grande potencial econômico, sendo uma das mais promissoras fontes de biocombustível no Brasil. As suas sementes apresentam teor de óleo entre 30 – 40% (SUBRAMANIAN et al., 2005). Com o advento do Programa Brasileiro de Biodiesel, o pinhão manso foi incluído como uma

alternativa para fornecimento de matéria-prima, devido a sua alta produtividade de óleo e baixo custo de produção. A sua utilização traz diversas vantagens, pois reduz a necessidade de importação do *diesel* obtido do petróleo. O produto extraído é pouco poluente; apresenta ampla importância de cunho social, uma vez que possibilita a geração de novos empregos e de renda.

Além de ser uma cultura potencial para a produção de biodiesel, o pinhão manso tem várias utilidades: O óleo tem valor de saponificação elevado e é utilizado na Índia e em outros países para fazer sabão (ADEBOWALE; ADEDIRE, 2006; AKBAE et al., 2009; KYWE; OO, 2009); também é utilizado na medicina tradicional e para fins veterinários; o látex contém o alcalóide semelhante a quinina em propriedades, a qual é denominada de "Jatrophine" que se crê ser anticancerígeno e é utilizada para aplicações externas em doenças de pele e reumatismo (THOMAS et al., 2008). A decocção das folhas é usada contra a tosse e como anti-séptico após o nascimento. Mas Devapps e Swamylingappa (2008) mostraram que as sementes de pinhão manso possuem fatores anti-nutricionais como: curcina e lectina que causam vômitos, diarréias, espasmos e pode levar até a morte, semelhantemente ao efeito de toxicidade da ricina encontrada na mamona; inibidores de tripsina, que provocam efeitos adversos em monogástricos; fitatos produzem efeitos sobre a biodisponibilidade de minerais; e ésteres de forbol, produto químico da família dos diterpenos altamente tóxico que causa a purga intestinal, irritação da pele e câncer.

Essa planta ainda apresenta um acervo de informações tecnológicas bastante restritas. Desse modo, é extremamente importante o conhecimento da estrutura e diversidade genética de populações de pinhão-manso, pois essas informações são importantes para delinear estratégias de melhoramento genético nesta espécie. A utilização de marcadores moleculares como RAPD, AFLP e microssatélites têm sido frequentes em diversas espécies, visando à caracterização genética. Com o pinhão-manso, poucos estudos foram realizados até o momento. Os trabalhos publicados recentemente utilizaram as técnicas RAPD (RAM et al., 2008; RANADE et al., 2008; SUDHEER-PAMIDIMARRI et al., 2009), AFLP (SUDHEER-PAMIDIMARRI et al., 2009) e DAMD (RANADE et al., 2008).

2. REVISÃO DE LITERATURA

A demanda mundial por biocombustíveis tem-se expandido rapidamente nos últimos anos, devido à preocupação com a redução do volume de emissões de gases causadores do efeito estufa até 2012, como determina o Protocolo de Kyoto. Essa demanda é verificada também no Brasil, pela necessidade de diminuir a dependência de derivados de petróleo nas matrizes energéticas nacionais e pelo incentivo à agricultura e às indústrias locais (NAPOLEÃO, 2005). Segundo Miragaya (2005), atualmente, cerca de 10% do diesel consumido no Brasil é importado. Esse combustível é o mais utilizado no País, principalmente no transporte de passageiros e de cargas. Anualmente, comercializa-se cerca de 38,2 bilhões de litros, o que corresponde a 57,7% do consumo nacional de combustíveis veiculares. Por outro lado, a disponibilidade das fontes agrícolas para produção de biodiesel varia de acordo com o clima e as condições da região de produção. O Brasil apresenta reais condições para se tornar um dos maiores produtores de biodiesel do mundo por dispor de solo e clima adequados ao cultivo de oleaginosas (MIRAGAYA, 2005).

Embora a soja apresente um rendimento de óleo por hectare inferior, quando comparada às demais alternativas, esta representa 90% do total do óleo produzido no Brasil. A mamona apresenta boa produtividade, mas ainda é vista com restrições, devido características químicas de seu óleo, que dificultam a produção de um biodiesel especificado. O pinhão-manso vem sendo cultivado em vários países asiáticos e da América Central, sendo considerado uma alternativa importante para a matriz de óleos vegetais destinados à produção de biodiesel. Embora tenha seu provável centro de origem na América Central (HELLER, 1996), ocorre espontaneamente em diversas partes do Brasil (FUNDAÇÃO CETEC, 1983a). É uma cultura perene com grande potencial como fonte de matéria prima para a produção de óleo com excelente qualidade para utilização na fabricação de biodiesel (FUNDAÇÃO CETEC, 1983b), em alternativa a culturas como girassol, mamona e soja, com relato de produtividades anuais de até 2.000 L de óleo por hectare, quando consideradas extrapolações da produção de árvores adultas isoladas (HELLER, 1996)

O pinhão-manso é uma planta considerada tolerante à seca e adaptada a solos de baixa fertilidade, mas pode ter sua produção bastante influenciada por falta de água e nutrientes. É também caracterizado como uma espécie rústica, capaz de produzir frutos nas mais diferentes condições edafoclimáticas. O pinhão-manso apresenta melhor desempenho em solos profundos, bem estruturados e pouco compactados, que permitam o sistema radicular

desenvolver-se e explorar um maior volume de solo, satisfazendo a necessidade da planta em água e nutrientes.

Devem ser evitados os solos muito argilosos, rasos, com umidade constante, pouco arejados e de difícil drenagem. A espécie é encontrada vegetando desde o nível do mar até 1.200 m de altitude. A produtividade do pinhão-manso varia em função da região, do método de cultivo e tratos culturais, bem como da regularidade pluviométrica e fertilidade do solo. Segundo observações preliminares realizadas em áreas experimentais de Mato Grosso do Sul, (ROSCOE et al., 2007), ao contrário do que se alega, a planta está sujeita a pragas e doenças que, caso não sejam adequadamente tratadas, provocam perdas consideráveis e podem causar a paralisação total do crescimento (caso do ácaro branco, cigarrinha verde e mofo branco).

O pinhão-manso não se desenvolve em solos muito úmidos, assim como já se sabe que o clima seco aumenta bastante o teor de óleo das sementes. Entretanto, três a quatro irrigações mensais, durante o verão, vão estimular o crescimento das plantas. Pode ser cultivado em áreas de solos pouco férteis e de clima desfavorável à maioria das culturas alimentares tradicionais, como por exemplo, no Semi-Árido nordestino. Os frutos do pinhão-manso são cápsulas que contêm em seu interior as sementes. As sementes são escuras quando maduras, onde se encontra um albúmem branco rico em óleo, em torno de 60,8 %.

Drummond et al. (1984) relatam que em área experimental de pinhão-manso conduzido sob irrigação por gravidade (sulcos de infiltração) na região de Janaúba-MG, as plantas aos 18 meses de idade, já haviam produzido 2500 kg ha^{-1} de sementes, com rendimento de 38% em óleo (semente fresca). Noutra região, conduzido sob sequeiro, em Latossolo Vermelho-Amarelo, na região de Flexilândia – MG, essa produção chegou apenas a 500 kg. Isso mostra que a planta, apesar de adaptada às regiões secas e possuir um caule grosso capaz de armazenar bastante água, sob regime de seca, sobrevive diminuindo sua produção de sementes. A irrigação por gotejamento parece ser a mais importante para aumentar a produção, pois por meio dela, pode-se controlar a quantidade de água e de adubos aplicados durante todo o tempo. Com este tipo de irrigação podem-se obter três safras por ano. A água pode umedecer apenas a área sob a copa deixando o restante seco, o que é interessante do ponto de vista fitossanitário (SATURNINO et al., 2005).

Embora esta planta apresente uma resistência natural a pragas e doenças devido ao seu látex cáustico, que flui quando ocorre um ferimento em seus tecidos, sabe-se hoje que, as pequenas plantações existentes estão começando a sofrer ataques de pragas, como o mofo

branco, o ácaro branco e vermelho e de alguns percevejos, além da cigarrinha (VEDANA, 2006). Quando essa é cultivada em sistema de monocultivo há relatos de insetos pragas como *Scutellera nobilis* Fabr. na Índia e *Pachicoros klugii* Burmeister na Nicaragua, afetando a queda de flores, aborto de frutos e má formação das sementes, causando grandes perdas econômicas (SHANKER e DHYANI 2006).

As maiores restrições na obtenção de um rendimento de óleo mais elevados e de qualidade dessa cultura são: a falta de informações sobre a sua variabilidade genética; composição do óleo e ausência de genótipos adequados para diferentes sistemas de cultivo. O conhecimento da relação genética e da variação da espécie é um pré-requisito em qualquer programa de melhoramento, pois permite a organização de um banco de germoplasma, para prever uma maior eficiencia no processo de seleção dos parentais (KARP & EDWARDS 1998). Apesar da sua importância ecológica e econômica, a taxonomia e estrutura genética do gênero *Jatropha* não estão totalmente esclarecidas, devido à ocorrência de hibridação natural entre as espécies (AIRY SHAW 1972). Além disso, o germoplasma disponível carece de informações sobre a base genética (SUJATHA et al 2008).

J. curcas é uma planta introduzida em muitos países da Ásia, África e América Latina e não tem ocorrido muitos esforços sistemáticos para a melhoria da cultura. Variedades melhoradas com características desejáveis para determinadas condições de crescimento não estão disponíveis, o que torna o plantio de pinhão-manso um negócio arriscado. Os objetivos para um upgrade genético da cultura deve visar um número maior de flores femininas e de plantas pistiladas, alta produção de sementes com alto teor de óleo, precocidade, resistência a pragas e doenças, tolerância e resistência à seca, redução da altura da planta e da ramificação natural dos ramos.

Como o pinhão-manso ainda não é uma cultura melhorada genéticamente, há diferentes características importantes que alguns acessos possuem e que os outros não têm, isto podemos observar através da Tabela 1, onde apresentam os diferentes países onde a planta existe e as suas características mais relevantes.

Tabela 1: Variabilidade fenotípica do pinhão-manso em vários países onde é cultivado

País	Variedade e Características visuais
Nicaragua	Sementes pequenas e pretas
Mexico	Genótipos não tóxicos (Estados Veracruz, Quintana Roo)
Cabo Verde	Propagação de genótipo principalmente através de sementes vigorosas
India	SDAUJ1 (Chatrapati)
China	CSC high oil 63; CSC high toxin 1
Indonesia	IP-1P e IP-2P para zonas úmidas; IP-1M e IP-2M para zonas intermediárias; IP-1A e IP-2A para zonas secas
Brasil	Goncalo
Malasia	BT-88; planta anã e com desenvolvimento precoce

Fonte: Sujatha M. Paper presented at FISA, México 2009

Uma grande variedade de técnicas têm sido utilizadas nos estudos de relações e variações em árvores florestais. Estudos têm sido realizados para identificar a variação genética nas populações, acessos, procedências e clones de *Jatropha curcas* L. através de técnicas tradicionais utilizando-se marcadores morfométricos e bioquímicos (PRABAKARAN & SUJATHA 1999; GINWAL et al. 2004; PANT et al. 2006; SUNIL et al. 2008). Esses trabalhos devem ser mencionados mesmo quando as características fenotípicas não forem confiáveis, por causa da influência do ambiente sobre a expressão gênica.

Rao et al (2008) avaliaram associações genéticas e variabilidade nos seguintes caracteres: sementes e crescimento em 32 árvores de alto rendimento, localizadas em diferentes regiões espalhadas por 150.000 km2 na Índia. Diferenças significativas foram observadas em todos os caracteres das sementes, isto é, morfologia da sementes e teor de óleo, bem como características de crescimento, altura da planta, a proporção de flores do sexo

feminino e masculino e produção de sementes no teste de progênie. A herdabilidade foi alta em geral e superior a 80% para todas as características das sementes estudadas.

Sunil et al. (2008) registrou as características fenotípicas das plantas de pinhão-manso *in situ* em quatro diferentes regiões eco-geográficas da Índia. Eles notaram diferença acentuada nos 9 caracteres que avaliaram em um total de 162 acessos em quatro zonas. Por exemplo, a altura da planta de 80% dos acessos em uma zona foi inferior a 1,5 m, enquanto em outra zona 60% dos acessos foram maiores do que 1,5 m. Diferenças similares foram observadas em número de frutos, teor de óleo e a sua composição. Como a maioria dos estudos anteriores, Sunil et al. (2008) não realizou a caracterização genética dos acessos, assim a razão para a variabilidade não estar clara.

A importância econômica do pinhão-manso tem gerado grande interesse na compreensão da diversidade genética da espécie, como passo inicial para a seleção e melhoramento de genótipos superiores. A avaliação da diversidade genética utilizando-se técnicas moleculares pode fornecer informações de base útil para programas de melhoramento genético. Os marcadores moleculares não são influenciados por fatores ambientais e podem ser estimados utilizando-se do DNA de todas as fases do crescimento e, portanto, são muito úteis na avaliação da diversidade genética das espécies de plantas. Dentre os diversos marcadores moleculares, aqueles baseados na técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) como o RAPD, ISSR e AFLP se tornaram populares, devido a sua aplicação não exigir qualquer informação anterior sobre uma sequência. Por outro lado, microsatélites ou (SSR) são os marcadores de escolha para aplicações de reprodução, mas seu desenvolvimento é mais demorado e caro.

Existem vários estudos sobre a diversidade genética molecular de *J. curcas* na China, mas os resultados se mostraram anômalos. He et al (2007) usando marcador ISSR relatou alto nível de diversidade genética entre oito populações de *J. curcas*. Em contraste, Sun et al (2008) utilizando SSR e AFLP detectaram uma diversidade genética muito baixa entre os materiais analisados nas mesmas províncias.

3. OBJETIVOS

Comparar geneticamente acessos coletados no estado de São Paulo (Alvinlândia, Itatinga, Jales e Lins) com acessos comerciais oriundos do Mato Grosso do Sul (Dourados) e de Minas Gerais (Janaúba), utilizando para o *"fingerprinting"* das amostras o marcador molecular AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*).

Detectar a potencialidade das técnicas de marcadores moleculares entre os acessos do México, Costa Rica, China e cinco amostras do acesso de Alvinlândia, sendo analisados através das técnicas: RAPD, RAPD-RFLP e AFLP.

Identificar e analizar as estruturas florais das inflorescências do pinhão-manso através das seguintes técnicas: microscopia eletrônica de varredura, de transmissão e microscopia de luz, procurando diferenças morfológicas entre os acessos estudados.

Testar a viabilidade polínica dos acessos de Minas Gerais e Mato Grosso do Sul coletados a campo utilizando-se quatro tipos de corantes.

4. MARCADORES MOLECULARES AFLP (*AMPLIFIED FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM*) NA CARACTERIZAÇÃO DE ACESSOS DE PINHÃO MANSO

RESUMO

O pinhão-manso é uma espécie com grande potencial para a produção de *biodiesel*, pois apresenta elevado teor de óleo nas sementes. No entanto, a espécie não é domesticada e os programas de melhoramento genético são recentes, carecendo de informações sobre a diversidade morfológica e genética da espécie. Este estudo teve por objetivo avaliar a potencialidade de marcadores RAPD, RAPD/RFLP e da técnica de AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) no *fingerprinting* de acessos de pinhão-manso de um *outgroup* (China, México e Costa Rica), e de um acesso brasileiro (Alvinlândia, coletado no estado de São Paulo). Posteriormente, foram caracterizados seis acessos brasileiros dos estados de São Paulo (Alvinlândia, Itatinga, Jales e Lins), Minas Gerais (Janaúba) e Mato Grosso do Sul (Dourados), sendo que somente a planta correspondente à cidade de Alvinlândia não estava localizada em plantio comercial da cultura, e sim cultivada isoladamente de outras plantas da mesma espécie. Os seis acessos foram caracterizados somente por AFLP. A técnica que melhor conseguiu detectar polimorfismo nos acessos foi a de AFLP porque mesmo sendo um marcador dominante, apresenta uma elevada cobertura genômica e os resultados apresentam alta reprodutibilidade. Em apenas um *primer* RAPD foi detectado polimorfismo, nas amostras do *outgroup*. Na análise de RAPD-RFLP não foi detectado polimorfismo no acesso de Alvinlândia. Ao caracterizar os seis acessos brasileiros, utilizando-se de seis combinações de *primers*, foi obtida uma ampla variação na percentagem de polimorfismo entre as amostras, este variando de 42% no acesso de Dourados (Mato Grosso do Sul) e de 66% no acesso de Janaúba (Minas Gerais), o que refletiu em diferentes valores de diversidade gênica Nei (H = 0,18 a 0,29) e índice de Shannon (I = 0,27 a 0,42). Foi realizada a análise de UPGMA (*Unweighted Pair-Group With Arithimethic Averages)* e obteve-se um agrupamento coerente, com a formação de dois grupos principais, em que os acessos de São Paulo, à exceção o de Itatinga, agruparam-se com o acesso de Minas Gerais. O outro grupo incluiu Itatinga e Dourados. Estes resultados sugerem que a maioria dos acessos de São Paulo se originou do acesso de Minas Gerais, o qual deve ter sido introduzido em várias outras regiões, e o de Mato Grosso do Sul e de Itatinga devem ter se originado em outra região geográfica. Esses resultados indicam que a espécie (*Jatropha curcas* L.), possui considerável variabilidade genética entre e dentro dos acessos estudados, tornando-a deste modo uma planta que requer aprofundamento maior em pesquisa na área de melhoramento genético para que sejam desenvolvidas variedades com características de interesse agronômico.

Palavras-chave: diversidade genética, similaridade genética, marcadores moleculares, diversidade de Nei.

CHARACTIRIZATION OF PHYSIC NUT ACCESSIONS BY MOLECULAR MARKERS AFLP (*AMPLIFIED FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM*)

ABSTRACT

Physic nut is a species with great potencial for producing biodiesel because it has a high oil content in seeds. However, the specie is not domesticated and breeding programs are recent, lacking information on the morphological and genetic diversity of the species. This study aimed to evaluate the potential of RAPD, RAPD/RFLP and AFLP technique (Amplified Fragment Length Polymorphism) fingerprinting of the accessions from an outgroup (China, México and Costa Rica, and Brazilian accessions (Alvinlândia, collected in São Paulo). Subsequently, six Brazilian accessions were characterized from São Paulo State (Alvinlândia, Itatinga, Jales and Lins), Minas Gerais (Janaúba) and Mato Grosso do Sul (Dourados), only the plant corresponding to the city of Alvinlândia was not located in a commercial plantation, but cultivated in isolation from other plants of the same species. The six accessions were characterized only by AFLP. The best technic for detecting polymorphism among accessions were the AFLP, even though itbeing a dominant scorer, it has a high genome coverage and the results were highly reproducible. In just a RAPD *primer* polymorphism were detected in samples from the outgroup. On the RAPD/RFLP analysis polymorphism was not detected on the Alvinlândia access. By characterizing the six Brazilian accessions, using six *primer* combinations, were obtained a wide variation on the percentage of polymorphism among the samples, it ranged from 42% in access of Dourados (Mato Grosso do Sul) and 66% in accessof Janaúba (Minas Gerais), which resulted in different values of Nei genetic diversity (H = 0,18 to 0,29) and Shannon Index (I = 0,27 to 0,42). Then the analysis of UPGMA (*Unweighted Pair-Group With Arithimethic Averages*) were performed and obtained a consistent grouping, with the formation of two main groups in which the accessions of São Paulo, with the exception of Itatinga, were grouped with the access of Minas Gerais. The other group includes Itatinga and Dourados. These results suggest that the majority of São Paulo accessions originated from the access of Minas Gerais, wich must have been introduced in several other regions, and Mato Grosso do Sul and Itatinga may have been originated in another geographic region. These results indicates that the species (*Jatropha curcas* L.), has a considerable genetic variability withing and among accessions, thus making it a plant that requires more in research on breeding for varieties that are developed with characteristics of agronomic interest.

Key-words: genetic diversity, genetic similarity, molecular markers, Nei’s diversity

4.1. INTRODUÇÃO

A caracterização e a determinação da diversidade genética em plantas podem ser realizadas por métodos isoenzimáticos ou pelo isolamento e análise de regiões particulares do DNA de seu genoma, que podem ser usadas como marcadores. O estudo do DNA permite a identificação de possíveis alelos importantes para a sua caracterização e diferenciação na população. Essas diferenças entre indivíduos ou grupos podem ser obtidas com o uso de diferentes estratégias moleculares que permitem isolar as diferenças em populações altamente endogênicas, com genomas muito semelhantes.

A técnica de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR na sua sigla derivada do Inglês - *Polymerase Chain Reaction*) possibilita efetuar uma análise simultânea de múltiplos indivíduos, através da presença/ausência de produtos de amplificação produzidos e, no caso de existência de diferentes grupos de indivíduos ou espécies, com o uso de iniciadores (*primers*) randômicos ou que visem à amplificação de regiões específicas. O método permite isolar preferencialmente grupos ou famílias através da identificação de seqüências únicas ou comuns dentro dos genomas em comparação.

Diversas técnicas de marcadores genéticos têm sido desenvolvidas, mas nenhuma é considerada universalmente ideal. A escolha do método depende da questão a ser pesquisada, da espécie envolvida e da resolução necessária, bem como do financiamento e da tecnologia disponíveis. Dentre eles podem ser citados: *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP), *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD), *Simple Sequence Repeats* (SSR ou microssatélites), *Variable Number of Tandem Repeats* (VNTR), *Inter-Simple Sequence Repeat* (ISSR), *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP) e, ainda, o seqüenciamento de regiões específicas do genoma (16S, 18S, ITS etc.).

Desde a sua introdução, marcadores do tipo RAPD têm se tornado populares pela sua versatilidade e facilidade na análise genética das plantas (WILLIAMS et al., 1990), tendo sido usados na identificação de cultivares (YANG; QUIROS, 1993), na determinação de parentesco (ELISIÁRIO; JUSTO; LEITÃO, 1999), avaliação das relações genéticas (NICESE; HORMAZA; McGRANAHAN, 1998) e estimativa da variabilidade genética da população (HARRISON et al., 1997). Os marcadores RAPD são usados geralmente para detectar polimorfismos em organismos para os quais são disponíveis insuficientes informações genéticas, mas eles podem também gerar altos níveis de artefatos PCR. Estes marcadores são gerados pela amplificação de segmentos de DNA ao acaso com *primers*

curtos (geralmente cerca de 10 nucleotídeos) de uma seqüência de nucleotídeos arbitrária. A PCR deve ocorrer sob relativamente baixa seletividade. Os produtos de amplificação devem ser presentes ou ausentes entre os indivíduos e se presentes, eles podem diferir em comprimento. RAPD são marcadores dominantes, mas alelos homólogos podem às vezes ser identificados com a ajuda de pedigrees.

As famílias de DNA repetitivo, objeto de análise em SSR ou microssatélites, são características livres de homoplasias e podem ser usadas para identificação de espécies em uma ampla variabilidade de situações ambientais. A ocorrência de seqüências repetitivas em forma de tandem, de DNA satélite altamente repetitivo, é uma característica de todos os organismos eucarióticos, sendo os tamanhos das repetições variando ao redor de 120-180 ou 320-370 pb . A seqüência de nucleotídeos das repetições satélites varia consideravelmente entre os diversos organismos, podendo ser usada para separação e identificação das relações evolutivas entre espécies relacionadas entre si.

Mais sofisticado e requerendo uma melhor resolução na biologia molecular para sua utilização através de detecção por fluorimetria ou radioatividade, os marcadores AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphisms*) (VOS et al., 1995) se tornaram populares para identificação de variedades (KIM et al., 1998), caracterização de germoplasma (CERVERA et al., 1998) e avaliação da diversidade genética (ZHU et al., 1998), seja para fins de gerenciamento de recursos genéticos como para uso em programas de melhoramento, entre outras funções. Tanto os marcadores RAPD como AFLP permitem, teoricamente, igual estimativa das seqüências de DNA ao longo do genoma, independente da sua localização nos cromossomos ou particularidades da sua seqüência de nucleotídeos. Porém, a maior razão multiplex dos marcadores AFLP faz deles mais adequados para a distinção entre genótipos mais relacionados entre si, tais como diferentes clones dentro de um determinado cultivar (CERVERA et al., 1998), que ocorrem muitas vezes sob pequenos eventos mutacionais, apresentando, portanto, diferenças genéticas mínimas, além de permitir inferência sobre modos de reprodução sexual x assexual (MUELLER; WOLFENBARGER, 1999). Também têm sido amplamente aplicados em análises de variação genética dentro de populações (TRAVIS; MASCHINSKI; KEIM, 1996; WINFIELD et al., 1998).

4.2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.2.1. Marcadores RAPD e RAPD-RFLP

Muitos têm sido os trabalhos de avaliação da diversidade genética e variabilidade em espécies vegetais, alguns voltados para estudos filogenéticos de mapeamento, aplicação em programas de melhoramento e, mais recentemente, para caracterização e identificação de variedades ou cultivares de produtos agrícolas ou indivíduos numa população (*fingerprinting)*. Karp et al (1997), em revisão das principais técnicas moleculares que podem ser utilizadas para o estudo de diversidade botânica, ressaltam que cada uma difere no modo de resolução quanto às diferenças genéticas, aos tipos de dados que são gerados e ao nível taxonômico. Entre as técnicas apontadas estão RFLP, RAPD, AFLP, VNTR, SSR e seqüenciamento por PCR.

Em 1990, Williams et al. descreveram a técnica de RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), sigla para DNA Polimórfico Amplificado ao Acaso, que permite de maneira rápida, avaliar o grau de similaridade entre genótipos, em níveis inter e intraespecífico. Simultanea e independentemente, outros dois pesquisadores, Welsh e McClelland (1990), publicaram a metodologia com o nome de AP-PCR (*Arbitrarily Primed – Polymerase Chain Reaction*), considerado como mais adequado, uma vez que os primers são arbitrários e, portanto suas seqüências-alvo são desconhecidas, porém a amplificação ocorre em lugares específicos do genoma e não ao acaso (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

O princípio da técnica assemelha-se àquele de duplicação do DNA, para a qual são necessários: uma fita de DNA a ser amplificada na forma desnaturada ou de fita simples; a presença de *primers* ou oligonucleotídios de 10 a 15 bases como iniciadores da Reação em Cadeia da Polimerase - PCR (Polymerase Chain Reaction), e uma enzima polimerase que catalisa a reação (Taq DNA polimerase). Esta reação consiste de ciclos repetidos de desnaturação, por aquecimento a 90- 95°C, anelamento dos primers, pelo resfriamento para 36-42°C, e extensão do DNA, por meio de um novo aquecimento a 70-75°C, permitindo a ação da Taq DNA polimerase, resultando na amplificação de um fragmento alvo. Após 35 a 45 ciclos o DNA amplificado pode ser visualizado em gel de ágarose (SAIKI et al.,1985; CRUZ; MILACH, 1998).

Os polimorfismos dos fragmentos são reconhecidos pela presença ou ausência de bandas de DNA amplificado no gel, identificando-se os marcadores genéticos entre indivíduos, variedades e populações diferentes (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). Alterações na seqüência de bases que porventura ocorram nas regiões complementares aos oligonucleotídios eliminam um sítio de ligação do oligonucleotídio, enquanto inserções de seqüências entre estes sítios resultam em um segmento molde maior que o limite da PCR (4 a 10 kb, dependendo da DNA polimerase empregada), de forma que a amplificação não ocorre, sendo ambas as mutações reconhecidas pela ausência da banda no gel.

Os RAPDs constituem uma classe de marcadores moleculares extremamente úteis em estudos de tipagem molecular, taxonomia, genética de populações, mapeamento genético (GLIENKE, 1995), identificação de variedades patogênicas, obtenção de marcadores para diagnóstico via PCR (BLANCO, 1999; GLIENKE-BLANCO et al., 2002) e análise de recombinação via parameiose em fungos mitospóricos (DALZOTO et al., 2003). A técnica apresenta vantagens quanto ao custo acessível, pois os reagentes podem ser utilizados em pequenas quantidades e não envolve hibridização ou radioatividade. Permite a obtenção rápida de marcadores, pois não exige o isolamento de sondas, seqüenciamento 29 de nucleotídios e nem o desenho de iniciadores específicos, além de caracterizar um bom nível de polimorfismo em várias espécies, com a obtenção de um número razoável de marcadores por gel (CRUZ; MILACH, 1998).

Além destas vantagens, o método requer pouco ou nenhum conhecimento prévio do genoma, bioquímica ou fisiologia do organismo em estudo (McCLELLAND; WELSH, 1990; CHRISTO, 2002). Oferece a possibilidade de automatização devido à natureza binária (presença ou ausência de banda) do polimorfismo. Se por um lado não permite a distinção de heterozigotos, é uma característica mais adequada hoje para automatização do processo de aquisição de dados dentro da sistemática binária de ambientes computacionais.

4.2.3. Marcadores AFLP

A análise de AFLP ou polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados representa a tecnologia mais recente para a obtenção de um grande número de marcadores moleculares, distribuídos em genomas de procariotos e eucariotos. Isto combina a especificidade, resolução e poder de amostragem da digestão com enzimas de restrição,

empregando a velocidade e praticidade de detecção do polimorfismo via PCR. Desde seu desenvolvimento e divulgação (EUROPEAN, 1993), esta técnica tem sido utilizada de forma crescente para o estabelecimento de *fingerprinting*, mapeamento genético localizado (*Bulk Segregant Analysis*) e construção de mapas genéticos, principalmente em espécies de plantas cultivadas com baixo polimorfismo de DNA (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

Esta técnica é poderosa e detecta um maior número de locos, a partir de quantidade em nanogramas de DNA, possibilitando assim uma ampla cobertura do genoma. Suas principais características são a alta especificidade, a boa reprodutibilidade e o alto poder discriminatório, sendo possível a resolução de um grande número de fragmentos em um gel (VOS et al. 1995). A combinação da análise por PCR com a utilização de enzimas de restrição, faz da técnica do AFLP uma ferramenta rápida, prática, com grande poder de resolução e uma alta especificidade (FERREIRA & GRATTAPAGLIA 1995)

A técnica de AFLP para caracterização de DNA ("*fingerprinting*") é um método que associa o poder da técnica de PCR com a confiabilidade da técnica RFLP, sendo particularmente indicada para mapeamento e caracterização, bem como para o cálculo de distâncias genéticas entre genótipos. Os marcadores AFLP, junto aos RAPD, destacam-se pela sensibilidade, simplicidade, rapidez e pela capacidade de revelar locos dispersos pelo genoma sem exigência de conhecimento prévio das seqüências-alvo ou de uso de sondas para hibridização (LOPES et al., 2002). AFLP é uma técnica baseada em PCR que envolve a restrição do DNA genômico, seguido pela ligação de adaptadores aos fragmentos gerados e amplificação seletiva por PCR de um subgrupo desses fragmentos. Os fragmentos amplificados são separados em gel e visualizados, por coloração com nitrato de prata e, mais recentemente, por fluorescência. Diversas enzimas de restrição e *primers* para seleção já estão disponíveis comercialmente, conferindo alto grau de flexibilidade e possibilitando a manipulação para diferentes aplicações e uma busca eficiente no genoma por polimorfismos.

A técnica de AFLP consiste essencialmente de quatro etapas. Na primeira o DNA genômico total do indivíduo é clivado com duas enzimas de restrição, uma de corte raro (6 a 8 pares de bases) e outra de corte freqüente (4 pares de bases), uma de cada vez. Na segunda etapa, adaptadores específicos são ligados aos terminais dos fragmentos genômicos gerados pela clivagem. Na terceira etapa, uma fração dos fragmentos gerados é amplificada seletivamente via PCR, utilizando *primers* especificamente desenhados para reconhecer seqüências nos adaptadores, com a presença de 1 a 3 bases adicionais na extremidade 3', e

marcados por radioisótopos ou fluorescência. Na quarta e última etapa, a subpopulação de fragmentos amplificados é separada em gel de alta resolução, sendo claramente visualizados os fragmentos de clivagem combinada rara/freqüente, de tamanho intermediário (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

O polimorfismo de AFLP depende da relação entre o número de nucleotídeos seletivos nos *primers* da PCR e a complexidade do genoma, resultando de mutações de ponto, inversões, deleções e inserções. Isto leva à perda ou ganho de um sítio de restrição, reconhecido pelas enzimas utilizadas, ou alteração da seqüência reconhecida pelos nucleotídeos arbitrários nos terminais 3' dos iniciadores que dirigem a PCR a partir dos adaptadores. Os marcadores AFLP apresentam-se, como os RAPD, dominantes, não permitindo a detecção de heterozigotos (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

Esta técnica, portanto permite determinar distâncias e similaridade entre materiais genéticos de origens diferentes, possibilitando a elaboração de dendrogramas, que tentarão elucidar questões a respeito da evolução filogenética e variabilidade genética dentro de um mesmo grupo. Este método tem sido utilizado para diferenciação de bactérias (VOS et. al., 1995; LIN et al., 1996), fungos (ROSENDAHL & TAYLOR, 1997; MURO et. al., 2003) e plantas (VOS et. al., 1995; DONINI et. al., 1997)

Entre as vantagens dos marcadores AFLP destacam-se: grande número de fragmentos gerados e resolvidos em um único gel, sendo muito eficiente na amostragem ampla e simultânea de um genoma; grande poder de detecção de variabilidade genética, explorando simultaneamente o polimorfismo de presença e ausência de sítios de restrição (como o RFLP), e a ocorrência ou não de amplificação a partir de seqüências arbitrárias (como o RAPD); maior robustez do ensaio AFLP quando comparado ao RAPD, devido ao fato que *primer*s bem mais longos são utilizados, aumentando a especificidade da amplificação (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

Dentre as limitações temos: baixo conteúdo de informação genética por loco, não discriminando genótipos heterozigotos de homozigotos; envolvimento de um maior número e complexidade de etapas que o RAPD, tornando-se menos acessível; digestão parcial ou má qualidade do DNA, que pode levar a interpretação errônea (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

4.3. MATERIAIS E MÉTODOS

4.3.1. Material Vegetal

O presente estudo foi dividido em duas etapas. Primeiramente, foram comparadas as técnicas de RAPD, RAPD-RFLP e AFLP, visando verificar sua potencialidade em detectar polimorfismos. Posteriormente, a técnica de AFLP, tendo em vista sua maior sensibilidade e cobertura genômica foi aplicada para a análise de um conjunto de seis acessos de pinhão-manso.

Na primeira etapa do trabalho foram analisadas amostras de um acesso de pinhão-manso situado no município de Alvinlândia, São Paulo. Para as análises de RAPD e RAPD-RFLP foram analisadas 12 plantas desse acesso. Essas plantas foram originadas de sementes colhidas de uma única planta matriz. Foi usado um *outgroup* com amostras amplamente contrastantes para verificar se cada uma das técnicas seria capaz de detectar polimorfismo: uma amostra da China, uma do México e uma da Costa Rica.

As análises de AFLP foram realizadas em seis acessos comerciais de pinhão-manso coletados nas seguintes localidades: Alvinlândia, Lins, Itatinga e Jales, situadas no estado de São Paulo; Dourados, do Mato Grosso do Sul; e Janaúba, de Minas Gerais.

4.3.2. Extração de DNA

Para a extração de DNA foram coletados tecidos foliares jovens de três indivíduos de cada acesso. O DNA foi extraído seguindo os procedimentos do método CTAB, de Doyle & Doyle (1990), com modificações. As amostras foliares foram maceradas na presença de nitrogênio líquido, sendo retirados 50 g que foram transferidas para tubos Eppendorf, adicionando-se 700µl de tampão de extração. Em seguida as amostras foram vortexadas e deixadas por 30 minutos a 65°C em banho-maria. Após este processo adicionou-se 650µl de CIA, homogeneizado e centrifugado por 7 minutos. Em sequência transferiu-se a fase aquosa a um novo tubo com 650µl de fenol, homogeneizado e centrifugado por 7 minutos. Em um novo tubo transferiu-se a fase aquosa e adicionou-se 650 µl de CIA, homogeneizado e centrifugado por 7 minutos. A fase aquosa foi novamente transferida a um tubo novo, adicionado 200µl de tampão de extração sem proteinase K, homogeneizado, adicionado 650µl de CIA, homogeneizado e centrifugado por 7 minutos. Em um tubo novo a fase aquosa foi transferida,

adicionou-se 650 µl de CIA e centrifugou-se durante 7 minutos. O DNA foi precipitado com Isopropanol e centrifugado por 7 minutos. Lavou-se a superfície com 250 µl de Etanol 70% preparado um pouco antes do uso (a cada lavagem centrifugou-se por 2 minutos). O precipitado foi seco num Concentrador de DNA por 10 minutos. Após, ressuspendido em 40 µl de Tris-RNAse (10 mM Tris - HCl, pH 8.0 + 10 µg/ml de RNAse) e deixado em Banho-Maria a 37°C por 30 minutos. Após esses procedimentos, as amostras foram congeladas a uma temperatura de -20°C.

ESTUDO 1

4.3.3. Potencialidades das técnicas de RAPD, RAPD-RFLP e AFLP na detecção de polimorfismos

Após a extração do DNA as amostras foram diluídas e quantificadas em Espectrofotometro NANODROP 2000. Com os resultados obtidos, foram realizadas diluições para uma concentração de 20 ng/µL. Essas amostras foram utilizadas para as reações de RAPD e RAPD-RFLP.

Para a técnica de RAPD foram utilizados sete diferentes tipos de *primers*, os quais estão devidamente descritos na Tabela 2. Para cada reação de PCR foram adicionados: água milli-Q autoclavada; tampão de PCR 1X; 0,12mM dNTP´s; 0,16 µM dos oligonucleotídeos utilizados; 1,6 mM de Cloreto de Magnésio; 1U de Taq polimerase e 20ng de DNA genômico, em volume final de 25µL.

A reação de PCR foi iniciada com quatro minutos a uma temperatura de 94°C para que houvesse a desnaturação inicial, seguido por 45 ciclos de: desnaturação a 94°C por 1 minuto; anelamento a 37°C por 1 minuto; e extensão a 72°C por 2 minutos, sendo que o último ciclo teve um período de extensão final a 72°C durante 10 minutos. Para a análise do polimorfismo, os produtos de amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5%, observados em transiluminador de UV e fotodocumentado.

Do produto obtido através das reações de RAPD elegeu-se o *primer* OPL 4 para a realização das digestões, visto que este foi o *primer* que apresentou o maior número de bandas. Foram realizadas duas digestões usando-se as seguintes enzimas: TaqI e EcoRI para uma digestão e HindIII e ApaI para a segunda digestão. O procedimento utilizado nas

digestões foi: do produto final do RAPD alicotar 5 µL, adicionando em seguida 5U de cada enzima e 1µL do tampão universal TANGO.

Na digestão utilizando-se as enzimas TaqI e EcoRI foram utilizadas as seguintes condições: digestão por duas horas a 65°C para digerir a enzima Taq1, seguida de um ciclo de 37°C por duas horas para digerir a enzima EcoRI, seguida por um ciclo de 70°C por 15 minutos para ocorrer a inativação das enzimas. Na digestão das enzimas HindIII e ApaI, como as duas enximas são digeridas na mesma temperatura, as condições finais se basearam em: digestão das enzimas a 37°C por um período de 2 horas, seguida por 70°C durante 15 minutos para a inativação da enzima.

Tabela 2 - Primers testados para as ampificação das reações de RAPD

Primer	**Identificação**	**Sequência**
1	OPC-20	5'-ACTTCGCCAC-3'
2	OPV-17	5'-ACCGGCTTGT-3'
3	OPG-17	5'-ACGACCGACA-3'
4	OPAW-17	5'-TGCTGCTGCC-3'
5	OPAN-03	5'-AGCCAGGCTG-3'
6	OPB-10	5'-CTGCTGGGAC-3'
7	OPAB-04	5'-GGCGTAAGTC-3'
8	OPAW-20	5'-TGTCCTAGCC-3'
9	OPAW-08	5'-CTGTCTGTGG-3'
10	OPJ-01	5'-CCCGGCATAA-3'
11	OPJ-15	5'-TGTAGCAGGG-3'
12	OPJ-04	5'-CCGAACACGG-3'
13	OPL-04	5'-GACTGCACAC-3'
14	OPAS-14	5'-TCGCAGCGTT-3'

Dentre estes *primers* foram selecionados sete para que as amostras do outgroup fossem analisadas (China, México e Costa Rica) juntamente com as amostras de Alvinlândia. Estes foram: *primer* 3 - OPG 17; *primer* 4 - OPAW 17; *primer* 5 - OPAN 03; *primer* 6 - OPB 10; *primer* 8 - OPAW 20; *primer* 13 – OPL 04; e *primer* 14 - OPAS 14.

Para a realização da técnica de AFLP, utilizou-se a metodologia de Vos et al (1995), com as combinações de *primers* da Tabela 3, a qual foi descrita com detalhes no Estudo 2 deste trabalho

Tabela 3 - Sequências dos adaptadores, primers da pré-amplificação e amplificação seletiva para as reações de AFLP

Sequências dos adaptadores	
Adaptador EcoRI	**Adaptador MseI**
5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3'	5'-GACGATGAGTCCTGAG-3'
3'-CTGACGCATGGTTAA-5'	3'-TACTCAGGACTCAT-5'
Primers **da pré-amplificação**	
Primer EcoRI-A	**Primer MseI-C**
5'-GACTGCGTACCAATTCA-3'	5'-GATGAGTCCTGAGTAAC-3'
Primers **da amplificação seletiva**	
EcoRI-AAA	5'-GACTGCGTACCAATTCAAAA-3'
EcoRI-AGC	5'-GACTGCGTACCAATTCAAGC-3'
EcoRI-ACG	5'-GACTGCGTACCAATTCAACG-3'
MseI-CGC	5'-GATGAGTCCTGAGTAACGC-3'
MseI-CAC	5'-GATGAGTCCTGAGTAACCAC-3'
MseI-CA	5'-GATGAGTCCTGAGTAACCA-3'

ESTUDO 2

4.3.4. Caracterização molecular por AFLP de seis acessos brasileiros

Após a extração de DNA genômico dos acessos acima descritos, as amostras de DNA foram quantificadas em gel de agarose 1,0%, comparando-se as amostras com um padrão de peso molecular (Low Mass), para posterior digestão.

Nas análises de AFLP, foram adotados os procedimentos de Vos et al. (1995), com modificações, seguindo-se quatro etapas:

(i) Digestão do DNA - para a digestão do DNA genômico cerca de 200 ng de DNA foram digeridos com duas enzimas, uma de corte raro (*EcoRI*) e uma de corte frequente (*Mse*-I). A

digestão foi realizada em volume de 50 µL contendo 5 U de *Eco*-RI (Fermentas), 5 U de *Mse*-I (Fermentas) e 5 µl de tampão de digestão REACT 1 (Invitrogen). A solução de digestão foi incubada em termociclador durante 3 h a 37 °C para a restrição do DNA e, em seguida, por 15 min a 70 °C para a inativação das enzimas.

(ii) Ligação dos adaptadores - Foram utilizados adaptadores específicos para cada uma das enzimas da digestão. Foram ligados às extremidades dos fragmentos de DNA gerados (Tabela 2). Os adaptadores de fita dupla foram previamente preparados misturando-se quantidades equimolares dos dois oligos de fita simples (20 µM para adaptadores *Mse-I*, 5 µM para adaptadores *Eco-RI*). A solução foi aquecida a uma temperatura de 94°C por 2 minutos e deixada resfriar lentamente. A reação de ligação foi preparada em volume de 10 µL [1X de tampão de ligação T4 DNA ligase, 1 µM de adaptador Mse-I, 0,1 µM de adaptador Eco-RI e 1 U de T4 DNA ligase (New England Biolabs)] e adicionada à reação de digestão anterior. A ligação foi realizada em termociclador à 20ºC durante dez horas, sendo que foi armazenado em freezer a -20°C até a sua utilização.

(iii) Pré-amplificação - Para a amplificação dos marcadores AFLP, primeiramente, foi realizada uma pré-amplificação com *primers* específicos, acrescidos de uma base seletiva, sendo a base A para o *primer* EcoRI e C para o MseI (Tabela 4.1). A reação foi realizada em um volume final de 10 µL contendo 2,5 U de Taq DNA polimerase (Promega), 1X tampão da Taq DNA polimesase (Promega), 1,5 µM de MgCl2 , 200 µM de dNTPs, 125 nM de cada *primer*, e 2,5 µl de DNA digerido e ligado. O programa de PCR utilizado foi composto por 26 ciclos de amplificação após a desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos. Cada ciclo foi constituído de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 56°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto. O ciclo final foi seguido de uma extensão a 72°C por 5 minutos.

(iv) Amplificação seletiva - A amplificação seletiva dos fragmentos realizou-se através das seguintes combinações de *primers* EcoRI/ MseI: A-CA, A-CC, A-CG, AA-CG, AG-CG e AG-CT, utilizando-se das seguintes condições: para um volume final de 20 µL contendo 1,0 U de Taq DNA polimerase (Promega), 1X tampão da Taq DNA polimesase (Promega), 1,5 µM de $MgCl_2$, 200 µM de dNTPs, 50 nM do primer EcoRI, 300 nM do primer MseI e 3 µl de DNA pré-amplificado e diluído.O PCR foi iniciado com 3 minutos a 94°C, seguido por 30 ciclos constituídos de: desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 54°C por 1 minuto, e extensão a 72°C por 1 minuto; e 23 ciclos com as seguintes temperaturas: 94°C – 30 segundos, 56°C – 30 segundos, 72°C – 1 minuto, 72°C por 2 minutos. As amostras foram

retiradas do termociclador e armazenadas no freezer a uma temperatura de -20°C até serem utilizadas novamente.

Após as reações, os produtos amplificados foram misturados em 8 μL de tampão de carregamento (98% formamida, 10 mM EDTA pH 8,0 e azul de bromofenol e xylenocianol como corantes indicadores). As amostras foram aquecidas por cinco minutos a uma temperatura de 94°C para a desnaturação e após o aquecimento foram rapidamente resfriadas para evitar a renaturação das fitas duplas. Cada amostra de 5μL foi carregada no gel de poliacrilamida desnaturante a 6%. Primeiramente realizou-se uma "pré-corrida", para a limpeza e aquecimento do gel por uma hora com uma corrente elétrica de 55 W de potência, em cuba contendo o tampão TBE 1X, para atingir a temperatura de 50°, a qual é a adequada para a corrida. Após este procedimento, os poços foram limpos com auxílio de uma seringa e as amostras foram aplicadas. A eletroforese foi conduzida em potência constante de 40 W por um período de aproximadamente quatro horas.

Para a revelação dos géis foi utilizado o método de coloração com nitrato de prata segundo o protocolo proposto por Creste et al., (2001). Após a coloração, os géis foram escaneados e as bandas foram visualizadas e analisadas no programa computacional BIONUMERICS versão 5.1. Os marcadores foram interpretados quanto à presença (1) ou ausência (0) de bandas, sendo geradas matrizes de dados binários. A partir das matrizes foi calculado o número de locos (bandas) polimórficos (P%), considerando polimórficos aqueles em que pelo menos um dos indivíduos apresentava ausência de banda. Além disso, foram calculados os valores de diversidade genética de Nei (H) e o índice de Shannon (I).

4.4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

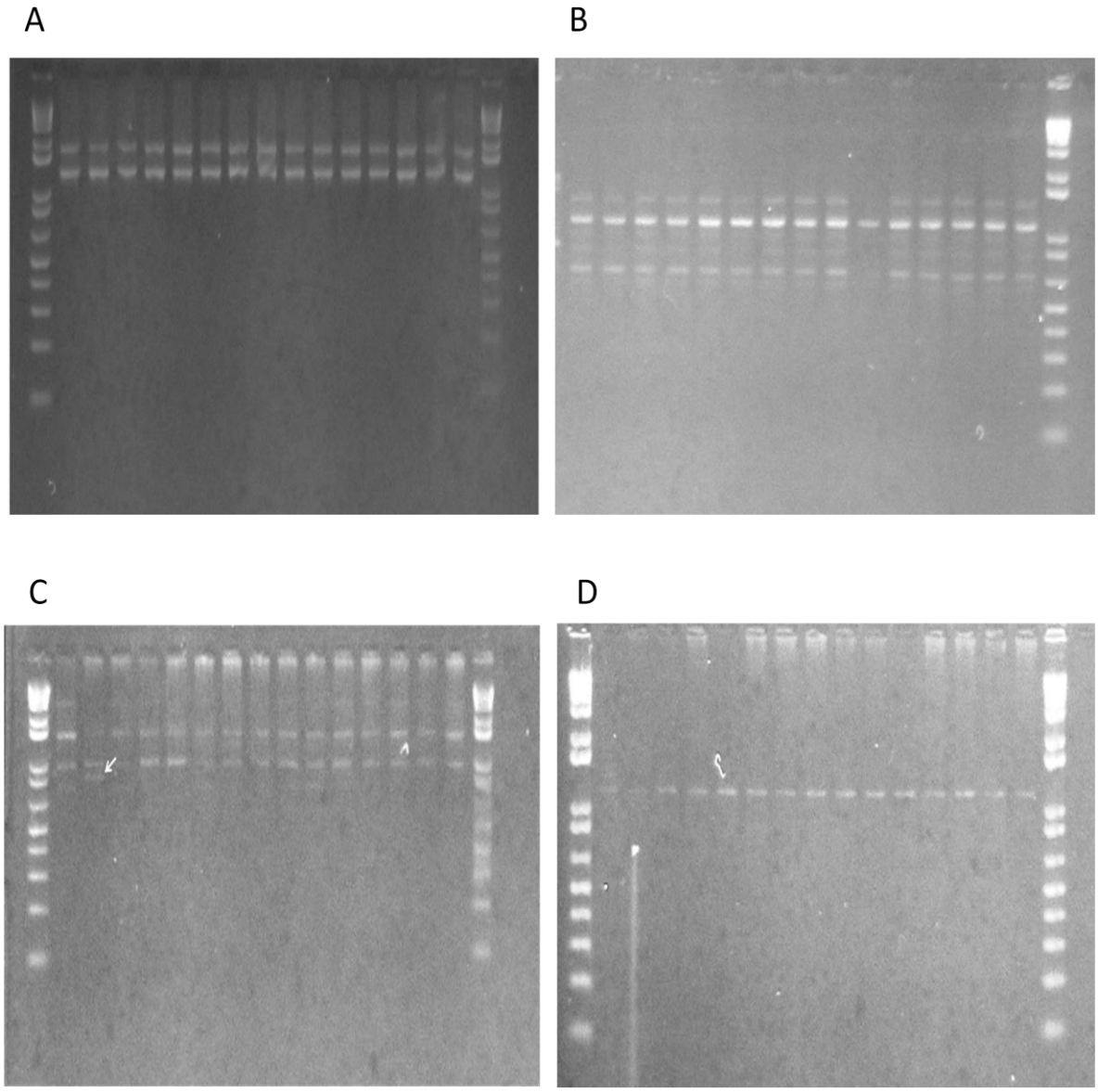
ESTUDO 1

4.4.1. Potencialidade das técnicas de RAPD, RAPD-RFLP e AFLP na distinção de acessos de pinhão manso

De acordo com as análises obtidas através dos géis de RAPD, utilizando-se os sete *primers* selecionados da Tabela 2, observou-se que o número de bandas detectadas variou de uma a seis. Quanto ao polimorfismo observado, visualiza-se na Figura 2C (gel referente ao *primer* 6 na Tabela 2) que há a ocorrência de uma única banda polimórfica e esta representa uma amostra do *outgroup* analisada e este polimorfismo foi encontrado somente na amostra

referente ao acesso do México. Essa técnica também demonstrou que mesmo utilizando-se de todos esses *primers* não foi possível detectar polimorfismo no acesso de Alvinlândia - SP. No entanto, quando se trata de amostras com origens diferenciadas, a técnica permite a detecção de polimorfismos, como já demonstrado em vários estudos com o pinhão-manso. Isto justifica o uso do *outgroup* na comparação entre as técnicas estudadas.

As outras amostras como pode ser observado através das Figuras 2 A, B, D e E mostram que os géis apresentam o mesmo padrão de bandas, isto é, somente bandas monomórficas, o que demonstra que esta técnica mesmo com a utilização de diversos *primers* não detecta a diversidade genética presente dentro de um único acesso, sendo sim uma técnica aconselhável para a distinção entre plantas de diferentes localidades (países) e de acessos distintos.



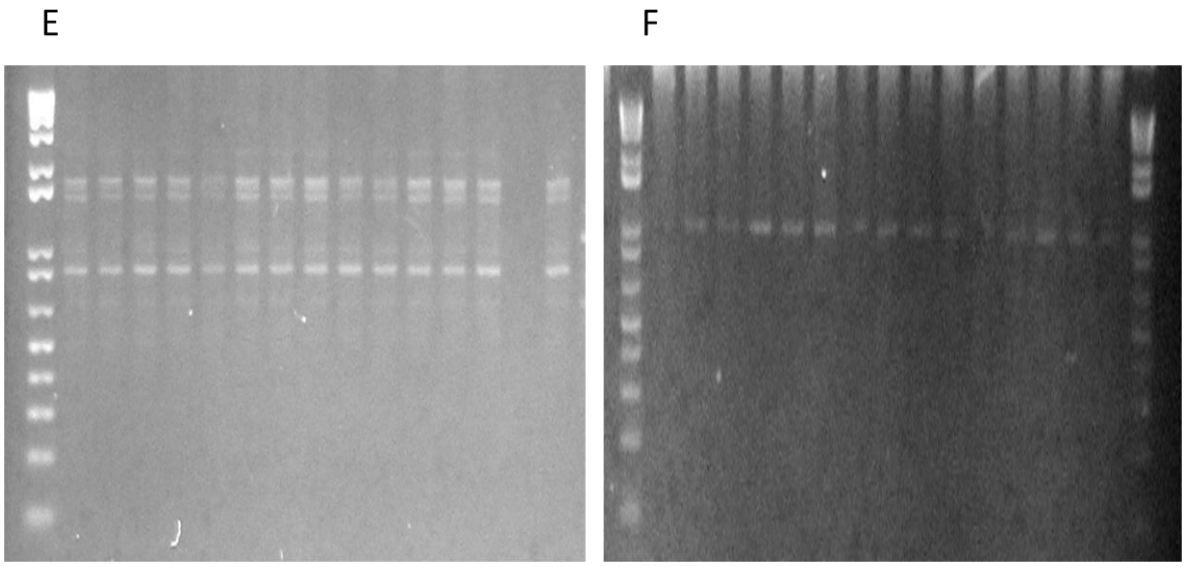


Figura 2 - Perfil de RAPD obtido para quatro amostras de pinhão manso, das seguintes procedências em ordem; China, México, Costa Rica e doze amostras de Alvinlândia coletadas no estado de São Paulo (Brasil), com a utilização dos seguintes *primers*: A - OPG-17; B - OPAN-03; C - OPB-10, sendo que este *primer* foi o único que apresentou uma banda polimórfica, representada pela seta; D - OPAW-20; E - OPL-04; F- OPAS-14

Mas para que se tenha um resultado desejável para a técnica de RAPD, e assim conseguir um alto grau de divergência, necessitaria que além da utilização esses *primers* utilizados no presente trabalho, fossem utilizados um número bem maior de *primers* para conseguir visualizar o polimorfismo entre as amostras. Mesmo assim, é improvável que seja detectado polimorfismo dentro do acesso de Alvinlândia.

A técnica de RAPD pode ser consideravelmente informativa, mas possui algumas limitações importantes que devem ser consideradas na análise, pois gera poucas bandas e os fragmentos gerados são randômicos, apresentando baixo poder de discriminação em comparação a outras técnicas utilizadas neste estudo.

Tendo-se em vista essas limitações, utilizou-se a técnica de RFLP, clivando o produto da amostra de RAPD através da digestão dos fragmentos, o que pode ser possível de detectar polimorfismo dentro dos fragmentos que foram cortados pelas enzimas.

Os dados de todos os marcadores utilizados no estudo são apresentados na Tabela 4.

Através dessa tabela, nota-se que o número total de bandas investigadas em todos os géis foi de 22, sendo que de todos os *primers*, somente um deles apresentou uma banda polimórfica, mostrando um total de 10% de polimorfismo quando se utiliza esta técnica.

Tabela 4 - Resultados Referentes aos marcadores moleculares RAPD, RAPD-RFLP e AFLP

RAPD			
Primers	**Número de Bandas Analisadas**	**Número de Bandas Polimórficas**	**Porcentagem de Polimorfismo**
OPG-17	2	0	-
OPAW-17	3	0	-
OPAN-03	5	1	10%
OPB-10	4	0	-
OPAW-20	1	0	-
OPL-04	6	0	-
OPAS-14	1	0	-
TOTAL	**22**	**1**	**10%**
RADP-RFLP			
Enzimas	**Número de Bandas Analisadas**	**Número de Bandas Polimórficas**	**Porcentagem de Polimorfismo**
TaqI/EcoRI	10	0	-
HindIII/ApaI	14	0	-
TOTAL	**24**	**0**	**-**
AFLP			
Primers	**Número de Bandas Analisadas**	**Número de Bandas Polimórficas**	**Porcentagem de Polimorfismo**
AAA-CGC	39	13	33,33%
AGC-CAC	41	14	34,15%
AGC-CA	20	3	15%
TOTAL	**100**	**30**	**-**

Após a análise dos RAPDs, os produtos foram digeridos com duas combinações de enzimas, sendo a TaqI uma enzima de corte freqüente enquanto que a EcoRI é de corte raro. A outra combinação é composta por uma enzima de corte freqüente HindIII e a de corte raro é a ApaI.

Após a digestão, as amostras foram colocadas em gel de póliacrilamida 6% e verificou-se o seguinte padrão de bandas mostrado nas figuras 3 a e b.

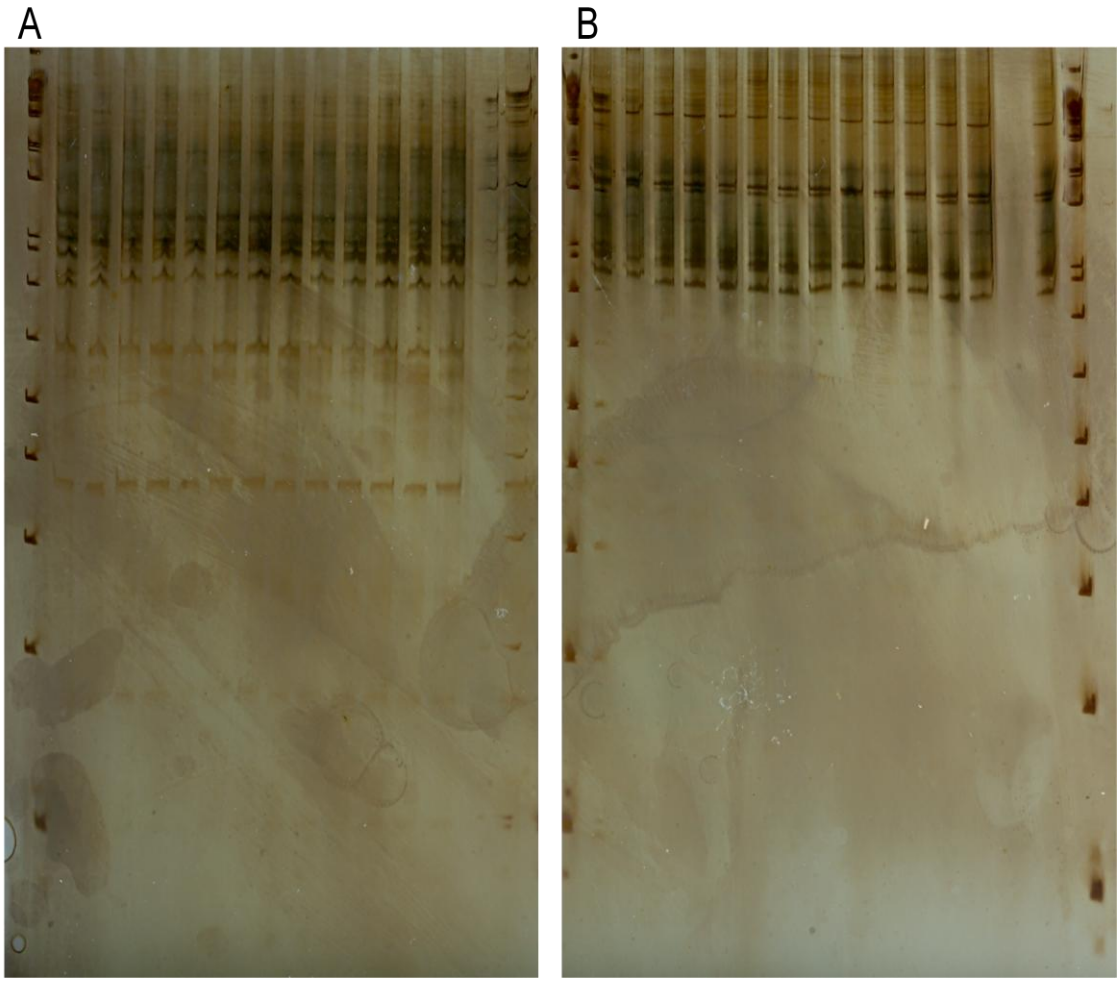


Figura 3 - Perfis eletroforéticos de fragmentos RADP-RFLP amplificados com as enzimas A - TaqI/EcoRI e B - HindIII/ApaI mostrando na ordem de cada gel: o marcador de peso molecular 1kb, seguido pelas amostras da China, México, Costa Rica, e mais doze acessos referentes a Alvinlândia

A análise do perfil de restrição gerado a partir dos fragmentos de RAPD não mostrou polimorfismo nas amostras. Não foi detectado polimorfismo dentro do acesso de Alvinlândia. No total, foram analisadas 24 bandas nos géis.

Através desses resultados nota-se que a técnica quando utilizada para a obtenção de resultados sobre a divergência dentro de um acesso como o de Alvinlândia, o qual é proveniente de uma única planta não se mostrou eficiente devido à baixa variabilidade no acesso estudado. Quando se analisou os acessos do *outgroup* também não ocorreu a presença de bandas polimórficas em nenhum dos acessos estudados, por isso não se pode inferir se a técnica se mostra eficiente ou não para a obtenção de bandas polimórficas, o que seria

importante fazer essa mesma análise conjuntamente com acessos provenientes de outros países e de outros estados, e utilizando outros *primer* RAPD (o *primer* 6 mostrou a ocorrência de polimorfismo, poderia ser utilizado nessa análise também), e outras enzimas para se ter uma maior abrangência nos resultados, podendo mostrar uma maior divergência.

Por todas essas limitações nas técnicas referentes ao RAPD e a digestão do seu produto (RAPD-RFLP), utilizou-se o AFLP que é uma técnica muito mais informativa como mostrado na Figura 4.

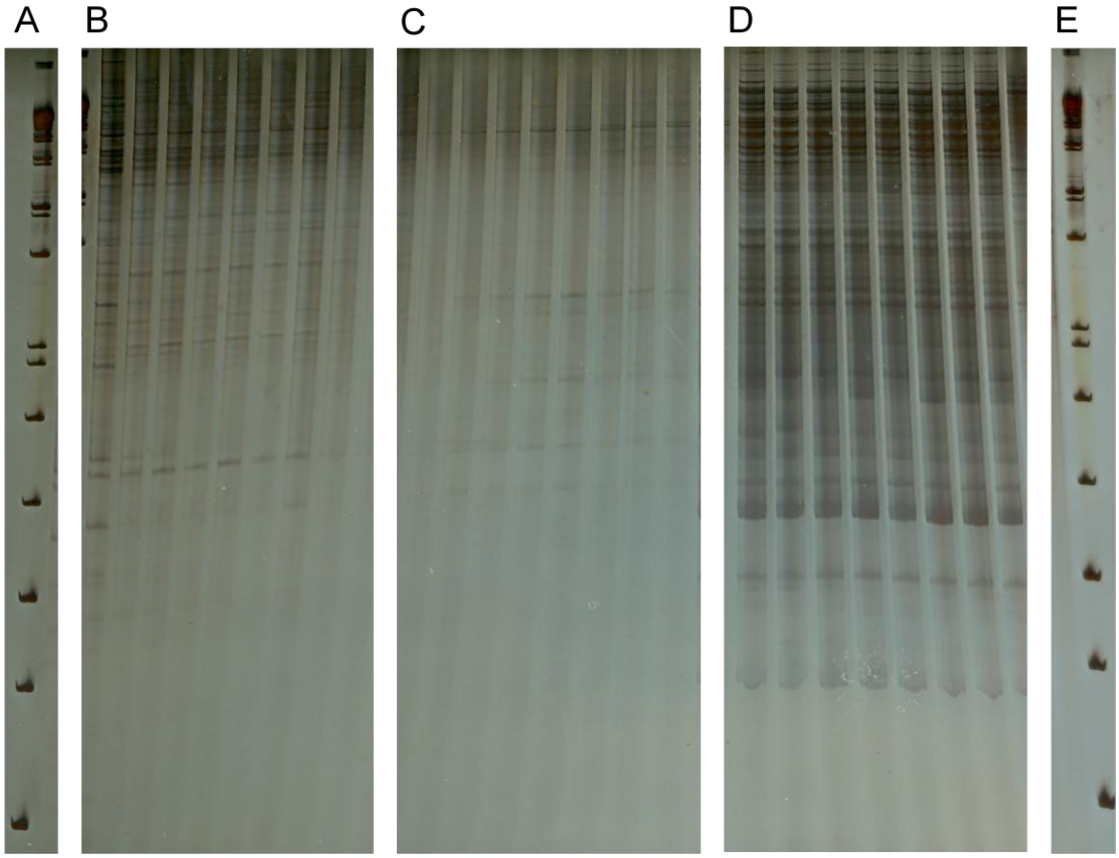


Figura 4 - Perfil eletroforético de fragmentos AFLP: A – Marcador molecular 100 pb; B – amplificação com os pares de *primers* AAA-CGC com as amostras na seguinte ordem: Costa Rica, México, China e cinco amostras referentes a Alvinlândia; C – amplificação com os *primers* AGC-CAC com as amostras seguindo a mesma sequência anteriormente citada; D - amplificação com os *primers* ACG-CA seguindo a mesma ordem das amostras; e E – marcador molecular 100pb

Os géis de AFLP foram devidamente analisados quanto à presença e ausência de bandas através do programa Bionumerics v. 5.1, o qual identificou em cada primer uma porcentagem de polimorfismo de 33,33% no *primer* 1 (AAA-CGC); 34,15% no *primer* 2 (AGC-CAC); e de 15% de polimorfismo no *primer* 3 (AGC-CA). O número total de bandas analisadas por esta técnica foram de 100 bandas, sendo que 30 delas se mostraram polimórficas, indicando polimorfismo de 30%.

Por causa destes resultados, esta técnica mostrou-se muito eficaz para detectar o polimorfismo nas amostras. Após as análises no programa, foi realizado um dendrograma, o qual está sendo indicado através da Figura 5.

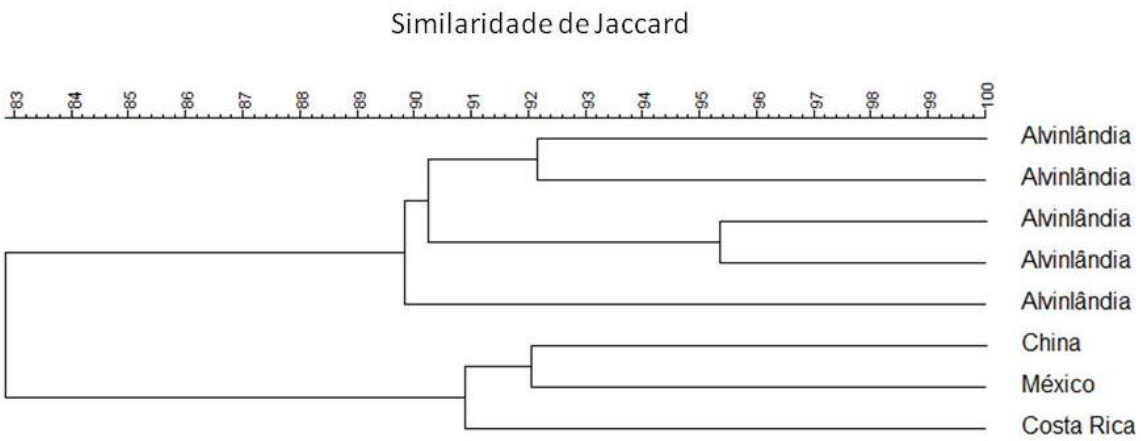


Figura 5 - Dendrograma elaborado através do método UPGMA (*Unweighted Pair-Group With Arithimethic Averages*) de seis acessos de pinhão-manso, analisados através de marcadores AFLP.

Através da análise do dendrograma obtido no programa Bionumerics, há o agrupamento das amostras em dois grupos distintos, sendo que um grupo apresentou somente as amostras de Alvinlândia, e no outro os acessos relacionados ao *outgroup*, isso é, referindo as amostras da China, México e Costa Rica, que se agruparam juntamente no *cluster*. Através deste agrupamento visualiza-se que as amostras referentes à localidade de Alvinlândia mostram uma similaridade entre as amostras no nível de 90% quando comparadas todas as amostras. Através dos resultados obtidos no dendograma, nota-se que a similaridade no grupo de Alvinlândia varia entre 90% a até aproximadamente 95,5%, mostrando que a técnica de AFLP foi eficaz para inferir as diferenças dentro do mesmo acesso.

Os dois grupos formados foram separados a um nível de 83% de similaridade, mostrando que os acessos de pinhão-manso não são muito diversos. O grupo identificado com

as plantas do outgroup (México, China e Costa Rica), a Costa Rica mostrou-se o acesso mais distante entre todos os três estudados, sendo que apresentou uma similaridade de aproximadamente 91%, enquanto que os acessos do México e da China se agruparam a um nível de 92% de polimorfismo, isso mostra que há diferença entre os países estudados quanto à divergência genética mostrando que há uma diferença maior quando comparados com o acesso brasileiro estudado.

A técnica de AFLP é mais trabalhosa e demorada do que a metodologia de RAPD, mas também é considerada por ser mais confiável, sendo capaz de detectar um grande número de bandas polimórficas em um único gel ao invés de altos níveis de polimorfismo em cada *locus*, como é o caso do método de SSR. Apesar desta menor sensibilidade em detectar classes genotípicas informativas pode ser associada com a incapacidade desta técnica de distinguir heterozigotos de homozigotos devido ao marcador AFLP ser dominante (GARCIA et al 2004).

Gerber et al (2000) sugerem que o elevado número de locos polimórficos revelado pelo método AFLP, contrabalança a perda de informação resultante da dominância, enquanto Garcia-Mas et al (2000) mostram que o AFLP apresentou maior eficiência na detecção de polimorfismo do que os marcadores RAPD e RFLP.

Garcia et al (2004) sugerem que os marcadores AFLP são a melhor escolha para a avaliação da diversidade e da determinação das relações genéticas entre linhagens de milho tropical pura com alta precisão em comparação com RAPD e RFLP.

Bekker et al (1995) mostraram que, apesar dos diferentes níveis de polimorfismo entre essas três classes de marcadores (RAPD, RFLP e AFLP), quando comparados entre as diferentes espécies, AFLP é ainda mais vantajosa, pois permite a análise simultânea de um grande número de Bandas de DNA por gel.

ESTUDO 2:

4.4.2. Análise da divergência genética de acessos de pinhão manso brasileiros por AFLP

O perfil eletroforético obtido através das combinações de primers utilizado neste trabalho está representado na figura: Eco RI A/ Mse I/AC (Figura 6)

A partir de todas as combinações de *primers* utilizados: EcoRI/ MseI: A-CA, A-CC, A-CG, AA-CG, AG-CG e AG-CT, foram geradas 255 bandas (locos), sendo que analisando o conjunto de todos os acessos obteve-se uma porcentagem bastante elevada de bandas polimórficas (P = 98%). Analisando-se os acessos separadamente, a porcentagem de polimorfismo mostrou resultados menores se comparados com o conjunto, estes variaram entre 42 e 66%. Esses valores refletiram considerável diversidade gênica, a qual é expressa pelo índice de diversidade de Nei também pelo índice de Shannon. Os valores de diversidade dos acessos variaram entre H = 0,18 a 0,29 e I = 0,27 a 0,42 (Tabela 5).

Tabela 5 - Porcentagem de locos polimórficos (P%), índice de diversidade gênica de Nei (H) e índice de Shannon (I), em acessos de pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.), analisados por marcadores AFLP

Acessos	Polimorfismo (P%)	Diversidade gênica (H)	Índice de Shannon (I)
Janaúba	66,00	0,29	0,42
Dourados	42,00	0,18	0,27
Itatinga	58,43	0,26	0,37
Lins	54,00	0,24	0,35
Jales	44,00	0,19	0,28
Alvinlândia	64,00	0,27	0,41

O elevado número de bandas polimórficas detectadas através de cada combinação de *primers* mostra a grande potencialidade da técnica de AFLP para a detecção de polimorfismo dentro dos acessos de pinhão-manso. Isso pode ser explicado pela natureza da técnica, em que as enzimas de restrição EcoRI e MseI são capazes de clivar o DNA em diversas regiões ao longo do genoma. Também, os diferentes valores de polimorfismo encontrados em cada acesso sugerem a sensibilidade da técnica de AFLP na detecção de diferenças entre os acessos. Isso, por exemplo, pode ser importante para analisar a diferenciação genética entre os acessos oriundos de São Paulo em relação ao de Minas Gerais e do Mato Grosso do Sul.

Os resultados apresentados na Tabela 5 mostram que ainda há uma grande heterogeneidade no genoma do pinhão-manso, isto é, variação na porcentagem de polimorfismo em um mesmo acesso, mostrando que a planta ainda não foi totalmente domesticada, e com isso não existe no mercado uma variedade melhorada.

Desse modo, a caracterização da diversidade da espécie pela técnica de AFLP é extremamente importante, visto que este método permite obter alta cobertura genômica e resolução. É necessário o aprofundamento dos estudos genéticos do pinhão-manso, para viabilizar o mapeamento de caracteres de interesse e a seleção assistida por marcadores moleculares, para auxiliar nos programas de melhoramento genético da espécie. Para isso, também é importante incluir outros marcadores moleculares em análises genéticas, como os microssatélites.

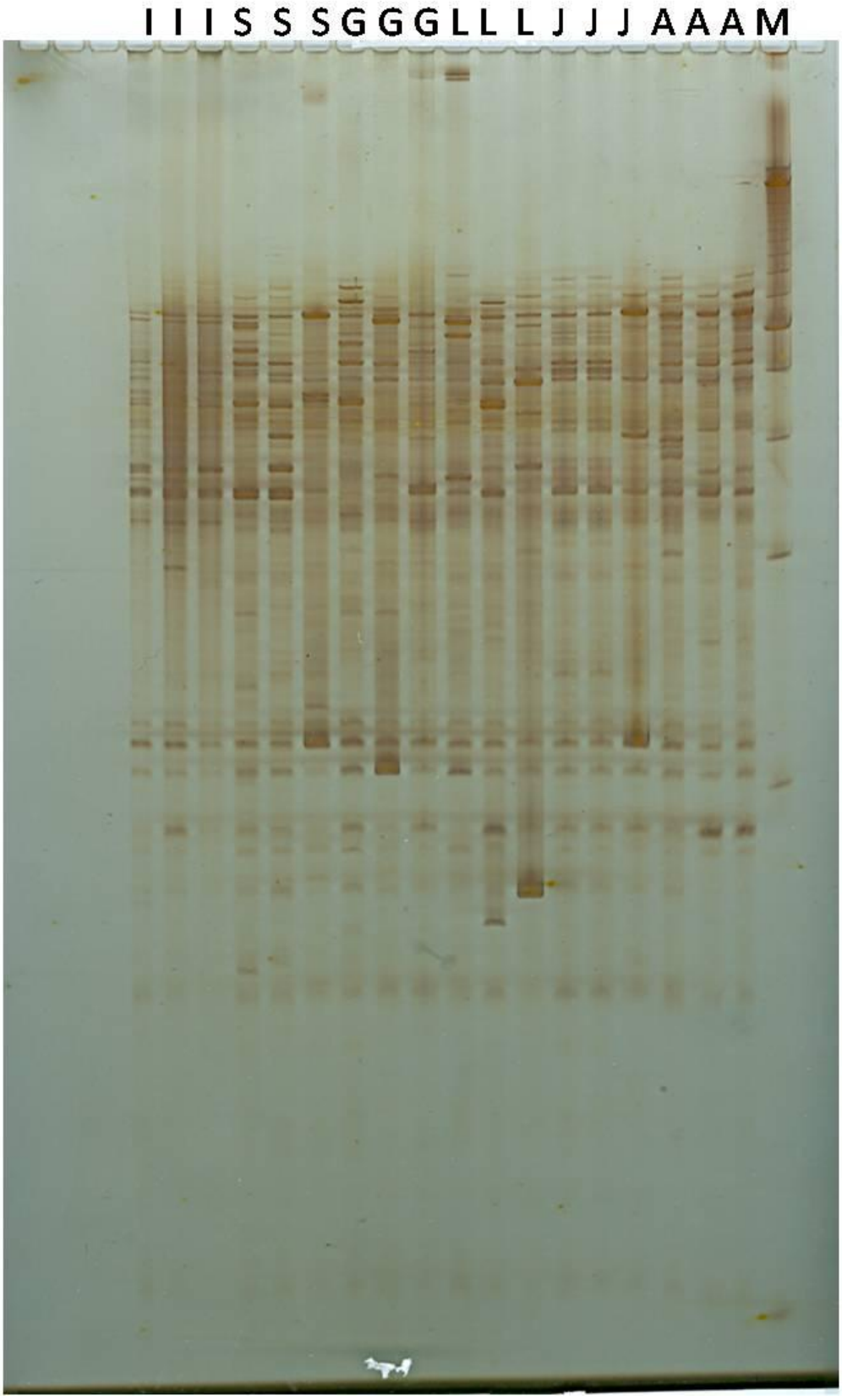


Figura 6 - Perfil eletroforético de fragmentos AFLP amplificados com os *primers* EcoRI-A e MseI-AC em seis acessos de pinhão-manso (*Jathropha curcas* L.). I: Itatinga (SP); S: Dourados (MS); G: Janaúba (MG); L: Lins (SP); J: Jales (SP); A: Alvinlândia (SP). M: marcador de peso molecular 100 pb

As análises de similaridade genética, apresentadas no dendrograma da Figura 7, mostraram resultados bastante coerentes. Os acessos de São Paulo, exceto Itatinga, enquadraram-se em um mesmo grupo. O material de Itatinga é provavelmente derivado de acessos coletados em Mato Grosso ou outros locais, por ser altamente similar ao acesso de Dourados (81%), Mato Grosso do Sul. O acesso de Janaúba constituiu um terceiro grupo, embora sob outra abordagem, possa ser incluído em um grupo maior, incluindo os acessos do estado de São Paulo. Janaúba constitui provavelmente a fonte do material genético distribuído para o estado de São Paulo. A similaridade entre Janaúba e os acessos de São Paulo foi de cerca de 81%. Os acessos mais similares foram os de Lins e Jales (cerca de 89%).

Esses resultados indicam que a espécie (*Jatropha curcas* L.), possui uma variabilidade genética considerável entre e dentro dos acessos estudados, tornando-a deste modo uma planta que requer aprofundamento maior em pesquisa na área de melhoramento genético para que ocorra o surgimento de variedades com características de interesse agronômico.

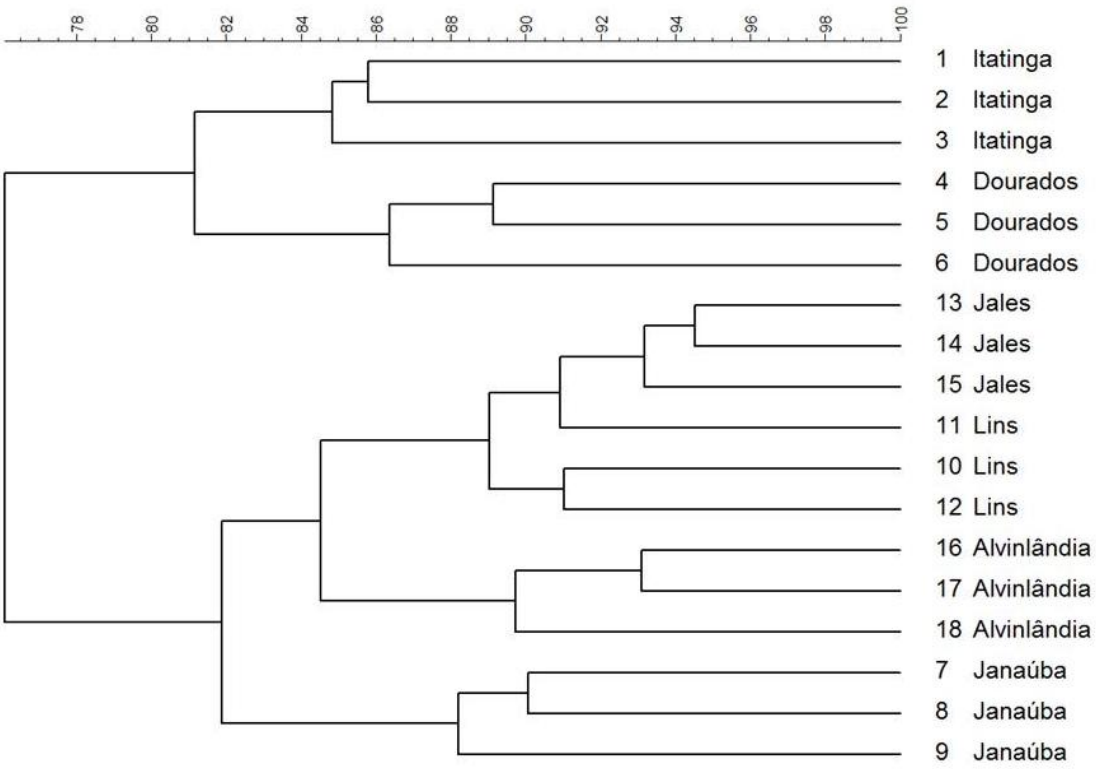


Figura 7 - Dendrograma elaborado através do método UPGMA (*Unweighted Pair-Group With Arithimethic Averages*) de seis acessos de pinhão-manso, analisados através de marcadores AFLP

A caracterização da diversidade da espécie pela técnica de AFLP é importante, visto que esta técnica possui uma alta resolução, especificidade e poder de amostragem da digestão com enzimas de restrição, além da velocidade e praticidade na detecção do polimorfismo. A partir desta técnica, pode-se, posteriormente, selecionar aqueles genótipos de maior interesse.

Muitos estudos foram conduzidos para acessar a diversidade e divergência genética nos acessos de pinhão-manso, a maior parte se originou na Índia, China e em outros países onde a espécie não é nativa. Relativamente poucos trabalhos têm sido registrados no seu centro de origem (América Central, África e outras regiões do trópico).

A avaliação da variação dentro de espécies envolvendo acessos de diferentes zonas agro-climáticas da Índia e da China tem sido realizada empregando uma ampla variedade de marcadores moleculares, os quais revelaram níveis baixos a moderados de diversidade genética. Basha & Sujatha (2007) avaliaram a extensão da diversidade genética em um conjunto representativo de quarenta e dois acessos de *Jatropha curcas* abrangendo diferentes zonas agro-climáticas da Índia, juntamente com um genótipo não tóxico do México através de marcadores moleculares a partir de 400 *primers* RAPD e 100 *primers* ISSR indicando níveis modestos de variação genética no germoplasma indiano. No entanto, entre 23 procedências selecionadas a partir de 300 progênies coletadas em toda a Índia, Reddy et al (2007) relataram polimorfismo relativamente baixo pelas técnicas de RAPD e AFLP.

Relações filogenéticas referentes a 13 genótipos de *J. curcas* de diferentes partes da Índia foram analisadas por Gupta et al (2008) usando 34 marcadores moleculares com base em PCR (20 RAPDs e 14 ISSRs) e notaram que os marcadores RAPDs foram mais eficientes que os ISSRs com relação a detecção de polimorfismo. No entanto, o poder de resolução (PR), número médio de bandas por primer, a diversidade genética de Nei (h), Índice de Shannon (I), a diversidade dos genótipos na população total (Ht), diversidade dentro da população (Hs) e fluxo gênico (Nm) mostraram estimativas maiores no marcador ISSR.

Na China, Sun et al. (2008) avaliaram a relação genética de 58 acessos de pinhão-manso de diferentes locais geográficos com base em seqüências simples repetidas (SSR) e AFLP. O agrupamento dos genótipos com base em marcadores AFLP mostrou que a diversidade genética de *J. curcas* em Guizhou região da China era nitidamente diferente das demais amostras analisadas.

Taikonda et al (2009) através de marcadores AFLP avaliaram a diversidade na coleção de germoplasma elite de pinhão-manso em seis diferentes estados da Índia. Quarenta e oito acessos foram utilizados com sete combinações de primers AFLP. Como resultado, os acessos provenientes de Andhra Pradesh foram encontrados diversos devido a estes se apresentarem espalhados em grupos diferentes no cluster obtido, enquanto acessos provenientes de Chhattisgarh mostraram uma ocorrência maior de números de fragmentos únicos /raros.

Recentemente Montes et al. 2009 estudaram 225 acessos de pinhão-manso oriundos de mais de 30 países na América Latina, África e Ásia. As amostras foram analisadas pela técnica de AFLP, mostrando que a variabilidade genética foi baixa nos acessos de pinhão-manso africano e indiano, mas uma alta variabilidade genética foi encontrada na Guatemala e outros acessos na América Latina.

Estes estudos têm demonstrado que marcadores moleculares fornecem uma ferramenta rápida e eficiente na caracterização da diversidade genética entre os clones, acessos e populações de *J. curcas* (SINGH et al 2010). Vários autores (REDDY et al. 2007; BASHA & SUJATHA 2007; GUPTA et al 2008; SUN et al 2008) também relataram a eficácia relativa dos sistemas de diferentes marcador, bem como o nível de baixa a moderada diversidade genética dentro da espécie *J. curcas.*

Para distinguir as variedades tóxicas das não tóxicas, foram identificados marcadores específicos utilizando as técnicas de RAPD e AFLP baseadas em PCR. Totalizando uma quantidade de 371 RAPDs, 1441 AFLPs analisados, 56 (15,09%) RAPD e 238 (16,49%) AFLP foram encontrados como sendo marcadores específicos para qualquer uma das variedades. A similaridade genética entre as variedades não-tóxicas e tóxicas foi de 0,92 para o marcador RAPD e 0,90 para o marcador AFLP no *fingerprinting* das amostras. Deste modo, demonstrou-se que ambas as técnicas foram igualmente competitivas na identificação de marcadores polimórficos e na diferenciação de variedades (PAMIDIAMARRI et al. 2008)

Basha et al. (2009) elucidou antecedentes genéticos de 72 acessos de Jatropha curcas, os quais representando 13 países diferentes através de análises moleculares e características bioquímicas. Foram anallisados: O teor de proteína presente nas sementes e nos grãos; teor de óleo, teor de cinzas e a quantidade de esteres de forbol, mostrando que houve variação desses teores se comparados com acessos do México, que aprensenta baixos níveis de ésteres de forbol. A caracterização molecular revelou polimorfismo de 61,8 e 35,5% com *primers* de

RAPD e ISSR, respectivamente, e através do teste de Mantel revelou-se uma correlação positiva entre os dois sistemas de marcadores.

A presença dos ésteres de forbol tóxicos é uma grande preocupação, e analisando-se 28 acessos mexicanos, resultou na identificação de marcadores moleculares associados com alto ou baixo teor de ésteres de forbol. Os marcadores RAPD e ISSR identificados foram convertidos em SCARs para aumentar sua confiabilidade e para o uso em programas assistidos por marcadores moleculares visando o desenvolvimento de acessos com toxicidade reduzida. Doze *primers* microssatélites diferenciaram o acesso não tóxico mexicano. Amplificação com *primers* específicos para a seqüência da curcina na região promotora da proteína inativadora de ribossomo (RIP) revelaram polimorfismo com um *primer* específico para a região promotora especificamente em acessos com baixos níveis de éster de forbol (BASHA et al. 2009)

.

4.5. CONCLUSÕES

- Através das análises obtidas utilizando-se marcadores moleculares RAPD, RAPD-RFLP e AFLP notou-se através deste estudo que a técnica de AFLP foi a mais adequada, visto que através desta técnica obteve-se um maior número de bandas por *primer* totalizando um total de 100 bandas em três *primers* analisados. Mostrou uma porcentagem de polimorfismo muito grande comparada com os outros marcadores utilizados, sendo eficiente para separar tanto os *outgroups* como o acesso de Alvinlândia.

- Os marcadores RAPD não foram muito eficientes para observar a divergência entre o acesso de Alvinlândia, mesmo mostrando a presença de uma banda polimórfica em um dos *primers* analisados. Para que se tenha um melhor resultado, outros *primers* deverão ser testados.

- Os marcadores RAPD-RFLP neste presente estudo, não se mostraram eficientes para acessar a divergência genética entre os acessos tanto do *outgroup* como os referentes à Alvinlândia, sendo que depois da digestão do produto do RAPD com duas combinações de enzimas, nota-se que não há a presença de nenhuma banda polimórfica.

- As análises utilizando marcadores AFLP mostraram-se muito sensíveis para a detecção de polimorfismo entre os acessos, sendo que além do número elevado de locos obtidos com os *primers* utilizados no estudo, mostrou uma grande quantidade de bandas polimórficas. Com isso podemos concluir que esta metodologia é adequada para se analisar com precisão os acessos de pinhão-manso.

- Os índices calculados da diversidade de Nei e o índice de Shannon mostraram que há divergência entre os acessos estudados. O cluster mostrou alta coerência, agrupando os acessos de São Paulo com o de Minas Gerais e o de Dourados foi agrupado com um dos acessos de São Paulo, provavelmente por ter origem comum.

5. MORFOLOGIA E ANATOMIA FLORAL DO PINHÃO MANSO (*Jatropha curcas* L.) EUPHORBIACEAE

RESUMO

A família Euphorbiaceae é considerada uma das maiores entre as angiospermas apresentando 300 gêneros e aproximadamente 7500 espécies. A maioria é representada por ervas, mas algumas, especialmente nos trópicos são arbustos ou árvores. O Pinhão Manso (*Jatropha curcas* L.) é uma espécie perene, decídua, alógama, é um arbusto ou árvore que apresenta grande potencial econômico, podendo alcançar uma altura de três a cinco metros, sendo altamente adaptável a diversas variedades de solo e clima. Recentemente, a espécie tem ganhado grande significância no Brasil por ser uma planta em potencial para a produção de biodisel, o qual se caracteriza como sendo uma fonte de recursos renováveis ambientalmente seguro. Este estudo teve como objetivo caracterizar a biologia floral do Pinhão Manso, que podem ser úteis posteriormente para a taxonomia desta família e ter um entendimento melhor sobre a sua reprodução e o desenvolvimento de sementes, além de detectar a viabilidade polínica dos acessos de Mato Grosso do Sul e Minas Gerais. Inflorescências foram coletadas no campo em diferentes estádios de desenvolvimento; vinte e cinco inflorescências foram separadas para determinar a percentagem de flores femininas e masculinas, depois foram observadas sobre estereomicroscópio e microscópio eletrônico de varredura. Os grãos de pólen foram acetolizados e observados em microscópio eletrônico de varredura e de transmissão para caracterização geral. Os que não foram acetolizados foram corados com quatro tipos diferentes de corantes, Alexander, Carmin Acético, Sudan IV e TTC. Nas 25 inflorescências analisadas, foram contabilizadas 908 flores, as quais 4,6% eram femininas e 95,4% masculinas. Nenhuma flor hermafrodita foi encontrada. Inflorescências que apresentavam somente flores masculinas foram visualizadas. As flores são de coloração amarelo esverdeado, organizadas em cimeiras, unisexuada, monóica (presença de flores masculinas e femininas na mesma planta) e homeoclamídea. A corola é pentâmera, gamopetalar, actinomorfa, presença de tricomas e campanulada; o androceu apresenta nove ou dez estames, com a ocorrência de cinco filetes livres e quatro ou cinco filetes soldados, com anteras dorsifixa e ereta. Na base dos filetes foram observados cinco nectários. O ovário é súpero, tri-locular, tri-carpelar, elipsóide, os óvulos apresentam-se solitários em um mesmo lóculo, presença de nectário na base. Foi observado também que o grão de pólen é grande, apolar, esférico, inaperturado, exina do tipo Padrão – Cróton. Este trabalho demonstrou que não há nenhuma diferença anatômica ou morfológica entre os acessos estudados. Já os testes de viabilidade polínica mostraram que há uma diferença significativa entre os acessos, sendo o de Minas gerais o que possui uma maior percentagem de viabilidade polínica. Foi possível também observar que o corante TCC foi o que apresentou o resultado mais adequado, pois conseguiu reproduzir melhor as condições de campo.

Palavras-chave: *Jatropha curcas* L.; *Euphorbiaceae*; microscopia; morfologia floral; viabilidade polínica

FLORAL MORPHOLOGY AND ANATOMY OF PHYSIC NUT (*JATROPHA CURCAS* L.) EUPHORBIACEAE

ABSTRACT

Euphorbiaceae is one of the largest family among the angiosperms with 300 genera and approximately 7,500 species. Most are represented by herbs, but some, especially in the tropics, are also shrubs or trees. Physic nut (*Jatropha curcas* L.) is a perennial specie, deciduous, alogamic, multipurpose shrub or small tree which can reach a height of three to five meters.and highly adaptable to different varieties of soil and climate. Recently, the species has gained tremendous significance in Brazil for being a potential biodiesel plant, which is characterized as an environmentally safe renewable resource, This study aimed to characterize the floral biology of physic nut, which can be useful for the taxonomy of this family and to have a better understanding about their reproduction and seed development, besides to detecting the pollen viability of the accessions of Mato Grosso do Sul and Minas Gerais. Inflorescences were collected in the field at different stages of development; twenty-five inflorescences were separated to determine the percent of male and female flowers, then were observed on a stereomicroscope (SM) and scanning electron microscope (SEM). The pollen grains were acetolyzed and observed by light microscopy and scanning electron microscopy for general characterization. Those who were not acetolyzed were stained with four different dyes Alexander, Carmim Acético, Sudan IV and TCC. On the 25 inflorescences, analysed, a total of 908 flowers were obtained, of which only 4,6% were female and 95,4% male. No hermaphrodite flower was found. Inflorescences composed of male flowers only were present. The flowers are greenish yellow colored, organized in cymes (inflorescence), unisexual, monoecious (presenting male and female flowers in the same plant) and homochlamydeous. The corolla is pentamerous, gamopetaly, actinomorphic, hairy inside and campanulate; androecium with nine or ten stamens, with the occurrence of five free filaments and four or five connate filaments with dithecous erect anthers. At the base of the filaments five nectaries are observed. The ovary is superior, three-locular, three-carpelar, ellipsoid, ovules solitary in each locule with the presence of nectaries at the base. It was also observed that the pollen grain is large, apolar, spherical, inaperturate, exine with Croton-pattern. This study demonstrates that there is no anatomical or morphological differences among the accessions studied. The tests showed that pollen viability had a significant difference among the studied accessions, showing that Minas Gerais has a higher percentage of pollen viability. It was also possible to observe that the dye TCC showed the result more suitable as it better reproduce the field conditions.

Key words: *Jatropha curcas* L.; *Euphorbiaceae*; microscopy; floral morphology; pollen viability

5.1. INTRODUÇÃO

A família Euphorbiaceae, possui cerca de 317 gêneros e 8.000 espécies, e se distribui principalmente nos trópicos e subtrópicos (CRONQUIST, 1981). Seus principais gêneros em número de espécies são: *Euphorbia* L. (1.500), *Croton* L. (700), *Phyllanthus* L. (400), *Acalypha* L. (400), *Macaranga* Du Petit Thouars (400), *Antidesma* Burman (150), *Drypetes* Vahl (150), *Jatropha* L. (150), *Manihot* Miller (150) e *Tragia* Plumier (150) (WEBSTER, 1994). De acordo com Barroso et al. (1991), ocorrem 72 gêneros e cerca de 1.100 espécies no Brasil, difundidas em todos os tipos de vegetação e apresenta diversas formas de vida.

Entre as espécies de ocorrência no Brasil inclui-se: espécies medicinais, ornamentais, de emprego industrial e uso alimentar. Mais comumente são conhecidas a mamona (*Ricinus comunis L.),* a seringueira, *Hevea brasiliensis* (Willd. Ex. Adr. De Juss) Muell. Arg. e a mandioca, *Manihot esculenta* Grantz (JOLY, 1993).

As plantas da família Euphorbiaceae destacam-se economicamente pela produção de óleo em suas sementes, este apresenta diversos usos na indústria de tintas, plásticos, plastificantes, sabões duros, sabões têxteis, fibras sintéticas, pigmentos para tecidos, perfumes, batons, cosméticos, dentifrícios, papel, fertilizantes ou como lubrificantes de motores de alta rotação e turbinas de aviões a jato.

Apesar do elevado número de espécies, os seus representantes podem ser reconhecidos por um conjunto de caracteres como porte arbóreo, arbustivo, subarbustivo ou herbáceo com folhas alternas, simples ou compostas, estipuladas, flores unissexuadas, em geral monoperiantadas e actinomorfas, em plantas monóicas ou dióicas, com ou sem vestígio do sexo atrofiado e disposto em inflorescências racemosas ou cimosas, com flores masculinas apresentando número de estames variável e flores femininas tipicamente tricarpelares, triloculares. Apresentam frutos secos deiscentes ou indeiscentes, comumente do tipo cápsula esquizocárpicas (tricoca), ou ainda cápsulas septífragas, loculicidas e circundantes, drupóides (filotrimídios, drupas e nuculânios) e bacóides (BARROSO et al., 1999).

Possui espécies hermafroditas, monóicas e dióicas, sendo, na maioria das vezes, visitadas por vários grupos de polinizadores, o que as caracteriza como “generalistas” (WEBSTER, 1994). Há, entretanto, exemplos como as espécies de *Dalechampia* L. cujas flores oferecem recompensas especializadas como resinas ou perfumes, sendo polinizadas por

abelhas Euglossini e Megachilidae (ARMBRUSTER; WEBSTER, 1979; SAZIMA et al., 1985; ARMBRUSTER; MCCORMICK, 1990; ARMBRUSTER; STEINER, 1992; ARMBRUSTER et al., 1992).

A análise da literatura disponível revela que informações sobre anatomia de órgãos reprodutivos de Euphorbiaceae são escassas, destacando-se os trabalhos de Graner (1942), Landes (1946), Singh (1954, 1969), Toledo (1963), Singh e Chopra (1970), Berg (1975), Lagôa e Pereira (1989), Paoli et al. (1995) e Tokuoka e Tobe (1998, 2002, 2003). A carência de análises estruturais dos frutos destaca importante lacuna no conhecimento, especialmente quando se considera que as Euphorbiaceae podem formar vários tipos de frutos, como os esquizocarpáceos, capsulídeos, drupóides, bacóides e, mais raramente, cápsulas indeiscentes (Barroso et al., 1999). Além disso, muitas das descrições existentes estão fundamentadas apenas em observações morfológicas, as quais produzem, muitas vezes, interpretações dúbias que não se sustentam à luz de análises anatômicas e ontogenéticas.

5.2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

5.2.1. MORFOLOGIA FLORAL DE *JATROPHA CURCAS* L.

No mundo todo, existe pouco conhecimento sobre esta planta, cujo gênero tem mais de 170 espécies, sendo a mais importante a *Jatropha curcas* L. Somente nos últimos 30 anos é que foram iniciados estudos agronômicos sobre a mesma, sendo uma espécie ainda não domesticada (SATURNINO et al., 2005).

De acordo com Beltrão (2006), não se conhece quase nada da bioquímica e fisiologia desta planta e até alguns aspectos agronômicos devem ser melhor investigados, pois esta possui elevada variabilidade natural, grande diversidade genética com polinização preferencialmente entomófila, podendo ter possivelmente elevada alogamia. Também ainda não existem cultivares definidas e o que se verifica é a necessidade urgente de selecionar espécimes e procedências que possuam características promissoras e alta adaptabilidade a diversos tipos climáticos.

Em plantas superiores, a transição da fase vegetativa para a fase reprodutiva envolve fatores exógenos (tais como fotoperíodo e temperatura) e endógenos (nível endógeno de fitohormônios e controle genético). O conhecimento da estrutura floral e da biologia reprodutiva numa cultura é básico para que o melhorista desenvolva técnicas de castração e

polinização adequadas (GOMES et al., 2001; SILVA et al., 2001). Segundo Damião Filho (1993), o rápido progresso alcançado no melhoramento das plantas cultivadas se deve aos estudos dos processos reprodutivos que ocorrem nas flores.

Alguns fatores característicos da espécie merecem especial atenção para futuros programas de melhoramento genético, como a necessidade de aumento do número de flores femininas por inflorescência, teor de óleo na semente, maior sincronismo na diferenciação floral e conseqüente antese por inflorescência. Senthyl et al. (2008), Sunil et al. (2008) e Popluechai et al. (2009) publicaram trabalhos recentemente com o objetivo de caracterização ou melhoramento genético de pinhão manso. Dados da literatura mostram que a abertura das flores masculinas e femininas pode ocorrer em períodos diferentes. Durante experimentações de campo, Heller (1996) observou um número de insetos diferentes que visitaram flores e realizaram polinização. Em Senegal, observou que as flores estaminadas abrem mais tarde que as flores pistiladas da mesma inflorescência. Com esta estratégia, a espécie desenvolveu um mecanismo que privilegia a polinização cruzada. Münch e Kiefer (1989) não observaram este comportamento cronológico em Cabo Verde, sugerindo que o mecanismo é influenciado pelo ambiente.

Os procedimentos adotados na execução dos trabalhos de melhoramento genético de espécies perenes frutíferas arbóreas dependem, fundamentalmente, do seu modo de reprodução, do conhecimento da biologia floral, inclusive a morfologia floral, do tipo de reprodução e dos aspectos relativos à polinização e à fertilização. São importantes, também, as consequências das alterações induzidas artificialmente no modo de reprodução, nos cruzamentos dirigidos e nas autofecundações. Além disso, o fruto e as sementes são economicamente as partes mais importantes da planta, o que justifica a consideração dada às flores, florescimento e frutificação (BARROS et al., 1999).

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 desenvolvidos. O florescimento inicia-se, normalmente, após um período de dormência da planta – no Brasil, isso ocorre após o inverno, quando a temperatura e a precipitação são reduzidas. Após a indução do florescimento, este se torna contínuo por períodos prolongados, de acordo com a disponibilidade de água no solo. A limitação de nutrientes também acarreta a paralisação do florescimento (JONGSCHAAP et al., 2007).

5.2.2. VIABILIDADE POLÍNICA

Estimativas da viabilidade polínica constituem um importante parâmetro em análises de fluxo gênico e em programas de melhoramento genético de plantas (MARTINS *et al*. 1981, BOTTO 1997), especialmente, quando se utilizam técnicas de polinização artificial para hibridação de espécies (SAHAR & SPIEGEL-ROY 1984, BOLAT & PIRLAK 1999, RODRIGUEZ-RIANO & DAFNI 2000).

Uma vez determinado o momento da maturidade do grão de pólen, sua viabilidade é estimada através de métodos colorimétricos ou germinativos (Dafni 1992, Kearns & Inouye 1993, Mulugeta *et al*. 1994, Souza *et al*. 2002). Entretanto, de acordo com alguns autores, a maioria dos métodos colorimétricos não é adequada para estimar viabilidade polínica (KING 1960, HESLOP-HARRISON & HESLOP-HARRISON 1970, RODRIGUEZ-RIANO & DAFNI 2000).

O teste colorimétrico com 2,3,5-cloreto de trifeniltetrazólio (TTC) reflete a atividade de enzimas desidrogenases envolvidas na atividade respiratória de tecidos vivos. Testes com outros corantes como Lugol e Sudan IV são utilizados em alguns estudos como indicativos de viabilidade polínica (SOUZA *et al*. 2002, HUANG *et al*. 2004). Entretanto, de acordo com outros autores, esses testes estão associados apenas à detecção de substâncias constituintes dos grãos de pólen, como amido e lipídios, que podem estar presentes tanto em grãos de pólen maduros como nos abortados (KING 1960, BEYHAUT 1988, RODRIGUEZ-RIANO & DAFNI 2000). Corantes, como o carmim acético e a solução de Alexander, são também utilizados como indicativos de viabilidade polínica (MULUGETA *et al*. 1994, DOMINGUES *et al*. 1999, RIGAMOTO & TYAGI 2002), porém para Báez *et al*. (2002) e Pline *et al*. (2002) estes testes refletem somente a integridade de estruturas celulares, como núcleo e membrana plasmática.

Segundo Stanley e Linskens (1974), nenhum teste de viabilidade é completamente satisfatório, principalmente após o pólen ter sido armazenado, pelas seguintes razões: os testes químicos usam corantes que reagem com constituintes químicos ou estruturas cujas presenças podem não refletir a capacidade de o grão de pólen germinar, o pólen armazenado pode germinar diferentemente em amostragens repetidas ou em diferentes meios.

5.3. MATERIAIS E MÉTODOS

- ESTUDO 1

5.3.1. Morfologia e anatomia dos órgãos florais

Para a análise do desenvolvimento floral do pinhão manso (*Jatropha curcas* L.), foram utilizadas inflorescências em diferentes estádios de desenvolvimento coletadas de plantas adultas no campo experimental da Empresa Biocapital e Participações SA, no período de novembro de 2009 inicialmente. As plantas apresentaram florescimento desuniforme após o término do período de dormência da planta, isto é, período do inverno, e sua duração foi prolongada durante vários meses devido a disponibilidade de água e de nutrientes favoráveis para o desenvolvimento floral. Estas inflorescências foram coletadas somente de dois acessos estudados neste trabalho: Mato Grosso do Sul (Dourados) e Minas Gerais (Janaúba).

Foram avaliadas 25 inflorescências quanto ao número de flores masculinas e femininas presentes em cada inflorescência. As flores, após a coleta, foram dissecadas cuidadosamente em estereomicroscópio e observadas todas as estruturas presentes, para detectar se a flor é feminina, masculina ou hermafrodita.

Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Imediatamente após a coleta, os materiais foram fixados em solução de Karnovsky modificado (glutaraldeído 2%; paraformaldeído 2% em Tampão cacodilato de sódio 0,05M PH 7.2), por um período de 72 horas a 4°C. Posteriormente, esse material foi desidratado em concentrações crescentes de etanol em água: 35% a 100%, com duração de 20 minutos em cada concentração, e três lavagens por um tempo de 20 minutos cada no etanol 100%.

A seguir, as amostras foram secas ao ponto crítico (em equipamento Balzers – CPD 030), montadas em suportes metálicos denominados de “stubs” usando-se fita adesiva dupla face e metalizadas com ouro coloidal (45 a 60nm) em metalizador (equipamento Balzers – MED 010). O material foi observado e fotografado ao microscópio eletrônico de varredura (Zeiss, modelo LEO 435 VP), no Núcleo de Apoio à Pesquisa/Microscopia Eletrônica na Pesquisa Agropecuária – NAP/MEPA, ESALQ/USP.

Microscopia óptica

Para os estudos em microscopia de luz os botões florais em diversos estádios de desenvolvimento foram fixadas em solução Karnovsky modificado conforme descrito para MEV, durante 10 dias a 4 graus celsius. Posteriormente, foram lentamente desidratadas em série etílica crescente (35%, 50%, 60%,70%, 90%) durante 15 minutos e etanol 100% (3x 20minutos) seguidas de propanol 100% e butanol 100%, pré infiltradas em butanol: meio de infiltração (3:1 v/v); (2:1) e (1:1) durante 24 horas, respectivamente. Em seguida as amostras foram imersas em meio de infiltração (historesina pura) durante 4 dias , até que as mesmas se apresentassem translúcidas e no fundo do recipiente. Após foram incluídas em Historesina (hidroxietilmetacrilato, Leica Heidelberg) com endurecedor conforme recomendação do fabricante onde permaneceram durante 4 dias à temperatura ambiente.

Os cortes seriados (5 μm de espessura) foram obtidos através do micrótomo RM 2155 (Leica) (Germany) e contrastados com azul de toluidina 0,5% em solução de bórax 1% (FEDER; O'BRIEN, 1968). As laminas foram cobertas com lamínula utilizando Entelan® e observadas ao fotomicroscópio marca Zeiss modelo Axioskop 2, acoplado a uma câmara fotográfica AxiosCamMR3 e um microcomputador (PC) empregando o software Image Pro-Plus, versão 3.0 para Windows do NAP/MEPA da ESALQ/USP, sendo as imagens digitalizadas.

Acetólise

A acetólise foi realizada de acordo com Erdtman (1952). A mistura acetolítica constitui-se de ácido sulfúrico + anidrido acético. A mistura foi preparada no momento da realização da acetólise, sendo adicionada aos tubos de vidro em quantidade suficiente para cobrir os polens contidos nos tubos. Colocou-se em banho-maria a uma temperatura de aproximadamente 80°C, durante 4 minutos. Após este procedimento adicionou-se água destilada para fazer a lavagem, sendo este processo repetido por quatro a cinco vezes com uso de centrífuga (1000 – 1500 rotações/minuto) durante dez minutos.

O material polínico lavado dos tubos foi depositado nas lâminas com gelatina-glicerinada para confeccionar as lâminas permanentes. Estas lâminas foram observadas através do microscópio ótico (Zeiss).

Microscopia eletrônica de transmissão

Para observação dos grãos de pólen, aos microscópios de luz e eletrônico de transmissão, os mesmos foram fixados por 48h, pós fixados em tetróxido de ósmio 1% durante uma hora a temperatura ambiente. A seguir foram desidratados em série crescente de acetona em água (25%-100%) e emblocados em resina Spurr. As secções semi-finas (120 µm) foram colocadas em lâminas e coradas com azul de toluidina (2% em água) por 5 minutos. As secções foram montadas utilizando Entellan, sendo após observadas e documentadas através de um microscópio de luz (Zeiss Axioscop 2). As secções ultrafinas (90 µm) foram depositadas sobre telas de cobre previamente recobertadas com collodion, contrastadas com acetato de uranila 2,5% em água e citrato de chumbo segundo Reynolds (1963). As análises foram feitas ao microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM 900 sendo as imagens digitalizadas. As imagens foram analisadas, medindo-se o tamanho das camadas (intina, nexina 1 e 2, columela, teto, escultura e exina), cinco imagens de 10 grãos de pólen, foram analisadas, sendo que medidas foram tiradas de cinco diferentes locais do grão de pólen, foi calculada a média e o desvio padrão.

- ESTUDO 2

5.3.2. Teste de viabilidade polínica

O material utilizado para este teste foi retirado de plantas adultas, com dois anos de idade, localizadas em Charqueada, na fazenda experimental da empresa Biocapital e Participações SA.

Os grãos de pólen extraídos foram aspergidos sobre a lâmina de vidro e corados com quatro tipos de corantes: 2,3,5-cloreto de trifeniltetrazólio (TTC) (DAFNI, 1992), carmim acético (KEARNS; INOUYE, 1993), Sudan IV (BAKER; BAKER, 1979) e Alexander (ALEXANDER, 1980) para investigar o corante mais eficiente para a estimativa da viabilidade polínica.

Após o preparo das lâminas utilizando os respectivos corantes, aguardaram-se 10 minutos para que ocorresse a reação, em seguida os grãos de pólen foram observados, com exceção do TTC, onde os grãos foram examinados duas horas após a adição do corante, já que a reação com TTC necessita de um período maior de incubação.

A fim de se obter uma amostragem ao acaso dos grãos de pólen corados, foi utilizado o método de varredura, sendo contabilizados 100 grãos de pólen/lâmina/genótipo com três repetições cada, perfazendo um total de 300 grãos de pólen para cada corante investigado, com auxílio de um microscópio óptico com lente objetiva de 10x marca Leica.

Consideraram-se grãos de pólen viáveis todo aquele que apresentasse as seguintes características: corados, formato circular de tamanho grande ou médio e uniformes. Os que não se enquadravam nessa classificação foram considerados inviáveis.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 2 x 4 (genótipo x corantes) com três repetições cada. Antes da análise de variância, os dados expressos em percentagem, foram transformados em arc sen ($\sqrt{x/100}$) para atendimento das pressuposições da ANOVA. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade, através do programa computacional SAS (2000).

5.4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

ESTUDO 1

5.4.1. Morfologia e anatomia dos órgãos florais

Observou-se que a floração das plantas de pinhão manso (Figuras 8a e b) estudadas no campo, está desigualmente distribuída durante o ano. Inicia-se após o período da seca (inverno), e, por ser uma planta caducifólia, o pinhão manso permanece numa dormência vegetativa, perde suas folhas no período do inverno, e inicia o crescimento vegetativo e reprodutivo somente com o início das chuvas. Quando a época da seca termina, a dormência é quebrada e as gemas meristemáticas vegetativas são transformadas em gemas florais reprodutivas, as quais irão formar inúmeras inflorescências. Conforme a disponibilidade de água no solo, as plantas podem florescer de outubro até maio.

Das inflorescências coletadas (Figuras 8c e d), foram contabilizadas quanto ao número de flores masculinas e femininas presentes em cada inflorescência, sendo que o resultado ratificou o que vem sendo colocado e discutido na literatura, ou seja, que há uma maior quantidade de flores masculinas em comparação com as flores femininas. Das 25 inflorescências analisou-se 906 flores no total. Os dados obtidos foram percentualmente 95,4% de flores masculinas e um percentual de 4,6% de flores femininas, distribuídas

desigualmente nas inflorescências, isto é, algumas inflorescências não possuíam nenhuma flor feminina, outras apenas uma e no máximo encontraram-se cinco flores femininas em uma inflorescência contendo mais de 100 flores.

Na Índia, Raju e Ezradanam (2002) relataram que uma inflorescência pode produzir de uma a cinco flores femininas e de 25 a 93 flores masculinas, com uma média de flores femininas para masculinas de 1:29. Bhattacharya et al. (2005) descreveram uma proporção de duas a 19 flores femininas para 17 a 105 flores masculinas por inflorescência, também na Índia. Assim, pode-se observar que esta é uma característica muito variável e que depende do material genético, da região, do clima, dos tratos culturais entre outros fatores.

Dhillon et al. (2006) observaram o florescimentos na parte terminal dos ramos após a época de chuva na Índia. No entanto, algumas plantas florescem mesmo em época de primavera (março/abril).

As análises por MEV revelaram que a inflorescência de *Jatropha curcas* L. é do tipo cimeira definida (Figura 9a), e está presente em posição terminal, isto é, ocorre nas pontas dos ramos. O desenvolvimento das flores ocorre a partir da flor central, sendo que a flor localizada nesta região é a primeira a entrar em antese, seguindo-se as outras adjacentes a esta. As flores são simétricas, as quais podem ser chamadas de actinomorfas. É uma espécie monóica díclina, apresentando flores estaminadas e carpeladas ou pistiladas na mesma inflorescência (Figura 9d). Dehgan (1984) relata a presença, ainda que rara, de flores hermafroditas em pinhão manso. No entanto, em nossas observações nenhuma flor hermafrodita foi detectada nas plantas da área experimental.

As flores de *Jatropha curcas* L. puderam ser descritas como flores incompletas, isto é apresentando flores unissexuadas femininas (Figura 9f) e masculinas (Figuras 9e, g), diclamídea homeoclamídeas, e pentâmeras, sendo compostas por cinco pétalas, cinco sépalas, com um número de estames podendo variar de 9 a 10, sendo que alguns filetes estão soldados no centro do androceu e cinco estão livres nas flores masculinas (Figura 9i). Houve a ocorrência de flores contendo todos os filetes livres do androceu. Liu et al. (2007) estudou a microsporogênese e a gametogênese masculina de *J. curcas*. As flores masculinas possuem 10 estames, cada um dos quais suporta quatro microsporângia; o desenvolvimento da parede da antera é do tipo das dicotiledônias, é composta de uma epiderme, endotécio, camada média e tapetum glandular.

Nas flores femininas observa-se a presença de carpelo com um ovário súpero (Figura 9h). De acordo com Chang-Wei (2007), a vida útil da flor feminina é de cerca de cinco a doze dias. A receptividade é forte durante o primeiro ao quarto dia, e começa a declinar a partir de quinto dia, perdendo completamente a receptividade em nove dias. Normalmente *J. curcas* mostra protrandria, isto é, as flores masculinas são as primeiras a entrar no estádio de maturidade, enquanto as flores femininas se abrem mais tarde, com a abertura de 60% do terceiro ao quinto dia. Há ainda várias flores masculinas que não se abriram após a abertura de todas as flores femininas; isso proporciona um tempo para o estigma ficar receptivo para obter o pólen das flores masculinas e aumentar a possibilidade de sucesso reprodutivo.

Há a ocorrência tanto nas flores femininas como nas masculinas de glândulas secretoras de néctar, isto é, os denominados nectários florais se apresentam de formas diferenciadas dependendo do sexo. Nas flores masculinas apresentam-se através de cinco glândulas de formato ovalado soldadas na base (Figura 9i), e envolve a porção basal dos filetes. Nas flores femininas ocorre o denominado disco nectarífero (Figura 9h), o qual é normalmente posicionado ao redor do ovário em uma posição central da flor. Quanto à função, ambos os nectários são considerados como nupcial, onde o néctar é procurado por determinados agente polinizadores.

Na antese, observou-se a presença de sépalas e pétalas possuindo uma coloração amarelo esverdeada (Figura 8d), sendo que, esta espécie pode ser considerada como uma planta alógama.

Solomon Raiu e Ezradanam (2002) mostraram que a antese ocorre ao amanhecer e que o período matutino constitui-se no mais importante para a polinização, visto que a disponibilidade de pólen reduz significativamente ao longo da manhã. Dehgan e Webster (1979) acreditam que possam ser polinizados por mariposas atraídas pelo perfume forte e doce exalado à noite por flores brancas esverdeadas, pela existência de anteras versáteis, órgãos sexuais projetados, néctar abundante e ausência de nectários visíveis. Battacharya et al. (2005), examinou o padrão da antese durante a manhã, com a posterior liberação de pólen de cada flor masculina, as quais produziram cerca de 1617 ± 100 grãos de pólen, com a relação pólen:óvulo sendo igual a 539:1. Os estigmas tornaram-se receptivos duas horas após a antese, coincidindo com a secreção de pólen.

Cada flor feminina produz uma quantidade de néctar equivalente a 4,54 ± 0,82 µl, o que corresponde a uma quantidade maior que o observado nas flores masculinas que possuem

uma quantidade de 1,92 ± 0,44 µl (DIVAKARA et al., 2010). Qing et al. (2007) registrou 17 espécies de visitantes florais, entre os quais 11 espécies são polinizadores (*Apis dorsata; Apis flores; Apis mellifera; Eumenes cônica; Vespa sp.*) com dois picos de visitas florais diárias, umas das 10:00 as 12:00 da manhã e outro das 16:00 as 17:00 da tarde. O teor de sacarose do néctar influencia a duração da visita na flor, a remoção e deposição de pólen sobre os estigmas pelas abelhas.

Constatou-se também que antes da abertura das flores (Figura 9) os botões florais apresentam-se envoltos por sépalas (Figuras 9a, b, l), as quais possuem na sua estrutura uma grande quantidade de estômatos (Figura 9c) e tricomas (Figura 9b). Estes tricomas são também encontrados no interior das flores adultas e podem ser classificados como sendo do tipo tectores unicelulares, ou simples (não-glandulares).

O androceu (Figuras 9e, g, i) apresenta-se como diplostêmone, pois apresenta o número de estames equivalente ao dobro do número de pétalas; isodínamo, apresentando todos os estames com o mesmo tamanho; exertos, estames que se sobressaem na garganta da corola ou do cálice; As anteras (Figura 9j) classificam-se como dorsifixas, sendo a abertura das mesmas do tipo longitudinal (é o tipo mais frequentemente encontrado na natureza, mostrando que a abertura ocorre por uma fenda longitudinal em cada teca), a qual promove a liberação dos grãos de pólen (Figuras 10a e b). As anteras possuem duas tecas.

O endotécio constitui a camada mais externa da antera e tem função na deiscência da antera. A constituição química é em geral celulósica, podendo ser acrescida de pequena quantidade de material péctico e lignina. O tapete é a camada mais interna da antera e apresenta as seguintes funções: nutrição do tecido esporogênico e dos andrósporos; síntese e liberação de materiais sobre o grão de pólen, como “Pollenkitt”, observado nesta espécie (material lipídico, flavonóide, carotenóides e produtos da degradação de proteínas do tapete). Esta intimamente envolvida no desenvolvimento dos grãos de pólen e é a fonte de importantes metabólitos. Observa-se a presença dessas duas estruturas envolvendo as tecas das anteras na Figura 9o.

As análises realizadas por microscopia eletrônica de transmissão (Figura 10d), acetólise (Figura 10c) e MEV (Figuras 10a, b) que os grãos de pólen de pinhão manso são grandes, esféricos, inaperturados, apolares, com sua exina contendo o padrão-Cróton na qual as unidades de ornamentação têm predominantemente de 5-7 subunidades de ornamentação. Estas subunidades contem ápices que são clavados e psilados (Figuras 10a e b). Os dados de

acetólise mostraram que o grão de pólen tem um tamanho médio de 85,20 ± 7,00 µm de diâmetro.

Até o presente momento não foram encontrados dados na literatura para grãos de pólen de *Jatropha curcas*, entretanto alguns autores estudaram outras espécies da mesma família, como o Cróton sp. Em estudos realizados em microscopia de luz, confirmam que os grãos de pólen de *Croton* L. apresentam ornamentação do tipo Padrão-*Croton*, com subunidades clavadas psiladas ou clavadas pontiagudas (PUNT, 1962); em número de 5-7 subunidades, posicionadas sobre uma área circular (SALGADO-LABOURIAU, 1967) ou ainda, com subunidades clavadas de forma circular a triangular (ROUBICK; MORENO, 1991). Oliveira e Santos (2000) mencionaram apenas, que as unidades estruturais (subunidades) podem ter formato homogêneo ou heterogêneo.

A esporoderme do grão de pólen constituiu-se de uma parede celular de grande complexidade, estratificada em camadas distintas com propriedades físicas e químicas específicas. Erdtman (1952) sugeriu uma terminologia morfológica para a estratificação da esporoderme, a qual hoje é composta por várias camadas e estruturas denominadas: exina, sexina, nexina I e II, intina, teto, columela e a escultura (Figura 10d). Essas estruturas foram medidas, tendo como base as imagens obtidas através do microscópio eletrônico de transmissão e esses parâmetros são medidos para fins de classificação taxonômica da espécie.

A exina é um dos primeiros estratos da esporoderme a ser formado, devido aos padrões de sua superfície externa. Em diferentes vegetais tem sido utilizada como um critério de classificação e distinção taxonômica. A exina é acetólise-resistente. Está estratificada em sexina, (camada ornamentada mais externa), a nexina (camada basal), que sustentam um teto.

Sobre o teto, ornamentações de formatos variados podem ser encontradas, como por exemplo: espinhos, clavas, báculas, estrias, verrugas, etc. A sexina é compacta, sem a presença de nenhum tipo de lamelação e apresenta consistência granular ou fibrilar. A nexina está presente no estrato basal da exina, onde se inserem as columelas e pode ser subdividida em nexina I e nexina II, as quais possuem composição química diferente.

A intina é o estrato da esporoderme mais interno, depositado após a formação da exina. Apresenta constituição predominante celulósica, acrescida de outros componentes como pectinas e proteínas. É totalmente destruída no processo de acetólise. A intina contém somente polissacarídeos como principais componentes estruturais.

Tabela 5 - Dados obtidos através da medida das camadas externas de 25 grãos de pólen de *Jatropha curcas* L., através de microscopia eletrônica de transmissão

Camadas da Exina	Média (µm)
Intina	0,21 ± 0,04
Nexina 1	1,13 ± 0,13
Nexina 2	0,27 ± 0,06
Columela	0,50 ± 0,15
Teto	0,22 ± 0,04
Escultura	4,27 ± 0,75
Exina	6,53 ± 0,96

Os dados da tabela acima podem ser utilizados futuramente em outros trabalhos que visem obter dados botânicos e taxonômicos desta família, e assim ampliar o conhecimento sobre a família *Euphorbiaceae*.

Análises das secções histológicas por microscopia ótica (Figuras 9l, m, n) mostram a formação dos primórdios das estruturas florais, do meristema floral e dos verticilos em desenvolvimento. Podem-se observar flores em uma mesma inflorescência em vários estádios de desenvolvimento, sendo que em algumas se notou o desenvolvimento completo das sépatas, pétalas e o desenvolvimento do órgão masculino (Figura 9l). Em outra inflorescência nota-se somente as sépalas protegendo os primórdios das pétalas (Figura 9n). Na posição central na Figura 9m nota-se que há a formação das sépalas e pétalas e pode-se visualizar o meristema floral formando o primórdio carpelar. Através da microscopia de luz não se encontrou indícios de tricomas e nem de estômatos nos tecidos cortados.

Observa-se também, que ocorreu primeiramente a formação das sépalas. Quando estas já estavam em um estádio de desenvolvimento adiantado, as células meristemáticas se dividiram para a formação das pétalas e depois o aparelho reprodutor masculino ou feminino foi formado. A formação desses órgãos se deu de uma forma centrípeta. A iniciação dos primórdios dos estames e do carpelo ocorreu no verticilo mais interno ao das pétalas.

O desenvolvimento do gineceu em *J. curcas* envolveu a diferenciação de três carpelos que começaram a se desenvolver no centro do meristema floral. Foi possível verificar que o estilete possui dimensões reduzidas e o estigma tripartido (Figura 9h), o qual se diferenciou na região terminal do gineceu. Foi observada a iniciação do nectário na base do gineceu que se

estendeu como um anel na base. Segundo Webster (1994) o nectário é uma característica de muitas flores de Euphorbiaceae. Em secção transversal, o ovário apresenta contorno que tende a ser mais circular, possuem três carpelos unidos.

A cavidade do ovário que contêm os óvulos denomina-se lóculo ou loja. A estrutura do ovário em pinhão manso esta disposta da seguinte maneira: o número de lóculos do ovário corresponde ao número de carpelos, na sua estrutura possuem três lojas contendo um único óvulo em cada loja (Figura 9k). De modo geral, esta é a estrutura característica das flores femininas na maioria das espécies da família Euphorbiaceae (WEBSTER, 1994).

O pinhão manso apresenta ovário súpero (livre), a flor pode ser caracterizada como hipógina, primeiro pela característica de possuir ovário súpero e o pistilo se localizar acima da inserção dos demais verticilos (perianto e androceu). A planta estudada não apresentou estames epipétalos, isto é, são adnados (aderentes) às pétalas.

O desenvolvimento do óvulo ocorreu em posição axial na cavidade do ovário (Figura 9k). O desenvolvimento do tegumento interno se iniciou primeiramente por divisões periclinais e anticlinais nas células da epiderme, delimitando a região do nucelo e do funículo.

ESTUDO 2

5.4.2. Teste de viabilidade polínica através de quatro corantes

De acordo com os resultados obtidos pela ANOVA observou-se que houve diferenças significativas na resposta de viabilidade tanto em relação aos acessos como os corantes testados (Tabela 6).

As maiores percentagem de viabilidade foram obtidas com os corantes, carmim acético e a solução de Alexander com valores respectivos de 89,0% e 87,2% (Tabela 6 e Figuras 10e, f). Não houve interação significativa entre os fatores estudados.

Com relação aos acessos estudados verificou-se que o referente ao Mato Grosso do Sul apresentou as mais altas percentagens de pólen viável com 81,81% quando comparado com o genótipo Minas Gerais com 77,2%.

Dentre os corantes estudados verificou-se que o Sudan IV apresentou menor percentagem de grãos de pólen viáveis com 72%, embora não diferiu aos obtidos pelo corante

TTC (2,3,5-cloreto de trifeniltetrazólio) com 70% de pólen corados. Nos demais testes colorimétricos, obtivemos um alto índice de grãos de pólen corados. Os grãos de pólen não corados apresentam tonalidade diferente e o conteúdo estravasado (Figura 10g).

Corantes, como o carmim acético e a solução de Alexander, são muito utilizados como indicativos de viabilidade polínica por muitos autores (MULUGETA et al., 1994; DOMINGUES et al., 1999; RIGAMOTO; TYAGI, 2002), porém para Báez et al. (2002) e Pline et al. (2002) estes testes refletem somente a integridade de estruturas celulares, como núcleo e membrana plasmática.

De acordo com Alexander (1980), os testes com solução de Alexander é capaz de diferenciar grãos de pólen abortados dos não abortados. Os grãos de pólen abortados não possuem o núcleo e apenas a celulose contida na parede apresentará coloração. Assim, essa solução pode ser considerada como uma ferramenta valiosa para os taxonomistas na identificação de híbridos por eles não apresentarem núcleo alterado.

No Sudan IV os grãos de pólen de todos os acessos estudados reagiram positivamente com o corante e o pólen apresentou coloração vermelha (Figura 10h), indicando que a natureza histoquímica dos grãos de pólen é lipídica. Quando corados com TTC, os acessos estudados de pinhão manso ficaram com uma coloração amarelada (Figura 10i), quando era de se esperar uma coloração vermelha, indicando a presença de enzimas desidrogenases ativas. Isto provavelmente ocorreu em função do tempo de exposição da reação do corante com o pólen que foi de 4 horas, necessitando, portanto, de um tempo maior para avaliação de 24 horas, já que nesse período já foi constatado uma coloração avermelhada dos grãos de pólen.

Tabela 6 - Porcentagem de viabilidade dos grãos de pólen de pinhão manso em diferentes corantes

Genótipo	**Viabilidade (%)**
Mato Grosso do Sul	81,91 a
Minas Gerais	77,20 b
Corantes	
Carmim acético	89,0 a
Alexander	87,2 a
TTC	72,2 b
Sudan IV	70,0 b
Média	79,58
CV	5,98

Médias seguidas por mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Diversos autores argumentam que o teste de TTC é uma estimativa confiável da viabilidade polínica, sendo próxima àquela fornecida pelos testes de germinação in vitro (BOLAT; PILAK, 1999; MULUGETA et al., 1994). Além disso, o TTC é muito utilizado por ser um método relativamente rápido e simples, muito embora alguns autores mencionem que o TTC pode fornecer coloração semelhante àquela de grãos viáveis (HESLOP; HARRISON, 1970).

Os testes com os três outros corantes (Alexander, carmim acético, e sudan IV), embora sejam técnicas muito atrativas pela simplicidade e rapidez, superestimam fortemente a viabilidade polínica quando comparados aos resultados obtidos com TTC e germinação *in vitro* (KING, 1960; HESLOP-HARRISON; HESLOP-HARRISON, 1970; STANLEY; LINSKENS, 1974; RODRIGUEZ-RIANO; DAFNI, 2000).

Uma consideração a ser feita é que foi observada a presença de uma bolha lipídica aderida à parede do grão de pólen (Figura 10h), sugerindo a presença de *pollenkit* nos pólen de pinhão manso. O termo *pollenkit* refere-se a uma substância presente na superfície do grão de pólen contendo componentes voláteis, atrativos para os polinizadores (TROLL, 1928), essa substância é altamente hidrofóbica, homogênea, fica envolta da exina do pólen maduro, e contêm lipídeos, carotenóides, flavonóides e ácidos graxos, todos secretados pelas células do tapetum (STANLEY; LINSKENS, 1974). De acordo com Lush (1999), os lipídeos restringem a perda de água no estigma e nos grãos de pólen, devido a sua natureza hidrofóbica.

Baéz et al. (2002), afirmam que quando o estigma é seco, como no caso de mamão, requer substâncias nos grãos de pólen para umedecê-lo durante a interação pólen x estigma (RODRIGUES-GARCIA et al., 2003).

Chang-Wei et al. (2007) estudou a viabilidade do pólen, receptividade do estigma e características reprodutivas e concluiu que, a vida útil da flor masculina é de cerca de dois dias, e a viabilidade do pólen é relativamente elevada, de nove horas após o florescimento, ficando baixa trinta e três horas depois, e o pólen praticamente não tem qualquer viabilidade após quarenta e oito horas.

Figura 8 - Plantas de pinhão manso em campo experimental de Jales (a e b), Charqueada (c) e na estufa do laboratório (d); a - planta adulta de pinhão manso, com todos os manejos culturais requerido; b - mudas de pinhão manso após a emergência; c - inflorescência do Pinhão manso coletadas na cidade de Charqueada apresentando todas as flores fechadas, nota-se que a maioria das flores é masculina, as flores femininas estão circuladas em preto; d – flores abertas do pinhão manso mostrando o seu aspecto amarelo esverdeado

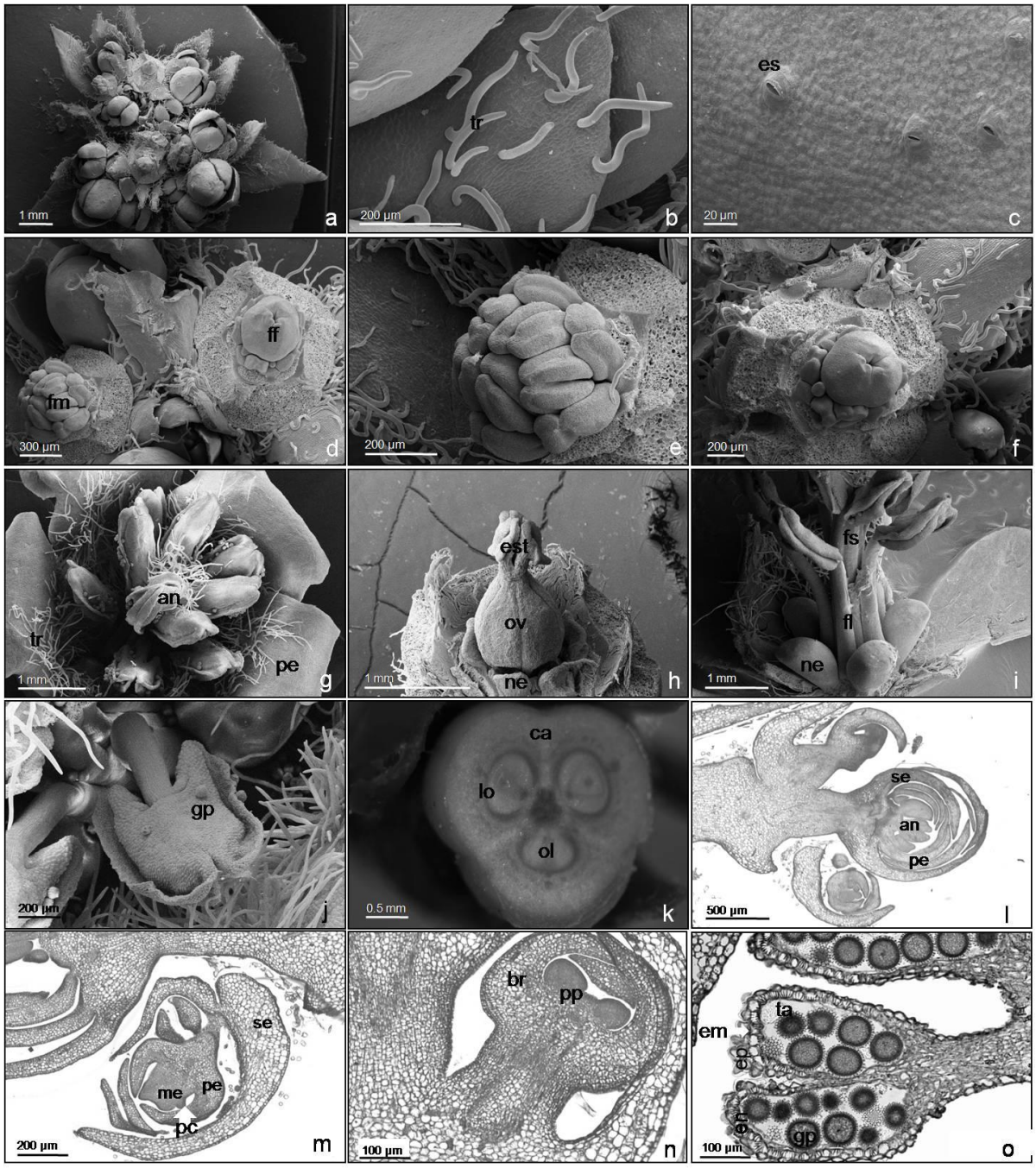

1 mm
a
tr
200 µm
b
es
20 µm
c
ff
fm
300 µm
d
200 µm
e
200 µm
f
an
tr
pe
1 mm
g
est
ov
ne
1 mm
h
fs
fl
ne
1 mm
i
gp
200 µm
j
ca
lo
ol
0.5 mm
k
se
an
pe
500 µm
l
se
me
pe
pc
200 µm
m
br
pp
100 µm
n
ta
em
gp
gp
100 µm
o

Figura 9: Aspectos da morfologia floral de *Jatropha curcas* L, através do MEV (a-j), esteriomricoscópio (k) e MO (l-o) a - vista geral da inflorescência no estádio inicial de desenvolvimento da inflorescência; b - detalhe dos tricomas do tipo tectores unicelulares; c - presença de estômatos na superfície das sépalas; d – flor feminina e masculina presente na mesma inflorescência; e - detalhe da flor masculina; f - detalhe da flor feminina; g - flor apresentando as pétalas, o aparelho sexual masculino, e a presença de vários tricomas; h - flor do sexo feminino com ovário súpero, e nectários em forma de disco; i - detalhe dos filetes da flor masculina sendo que cinco são soldados e cinco estão livres; j - antera dorsifixa com grãos de pólen aderidos; k - corte transversal mostrando ovário tricarpelar, trilocular e triovular; l - corte histológico mostrando uma flor prestes a se abrir com as sépalas, pétalas e o androceu já formado; m - flor mostrando as pétalas e sépalas já formadas, a presença de um meristema floral e o aparecimento do primórdio dos carpelos (seta); n - flor em um dos estádios mais iniciais do desenvolvimento apresentando somente as sépalas formadas e os primórdios das pétalas; o- antera bivalve, mostrando as células da epiderme, endoderme e poucas células do tapetum, mostrando grãos de pólen praticamente formados, prontos para serem eliminados durante a antese pela abertura do estômio. (tr- tricoma; es- estômatos; fm- flor masculina; ff- flor feminina; pe- pétala; an- antera; est- estigma; ne- nectário; ov- ovário; fs- filete soldado; fl- filete livre; gp- grão de pólen; ca- carpelo; lo- lóculo; ol- óvulo; se- sépala; me- meristema floral; pc- primórdio do carpelo; pp- primórdio pétalas; ta- tapetum; en- endotécio; ep- epiderme; em-estômio

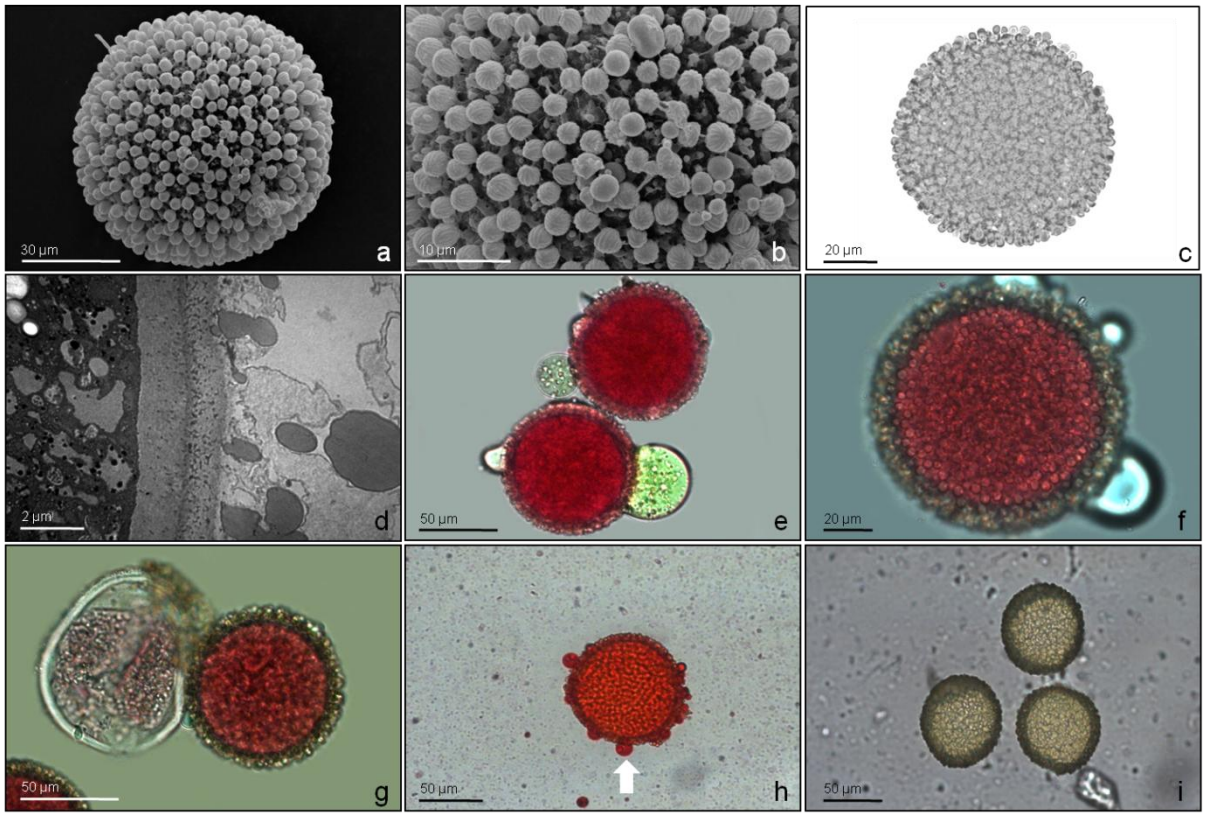


Figura 10 - Aspectos do grão de pólen MEV (a e b) MET (d) ML (c, e-i) a - vista geral do grão de pólen; b - grão de pólen mostrando o tipo de ornamentação da espécie (tipo-Cróton) com ápice psilado apresentando mucilagem, entre as subunidades; c - grão de pólen acetolizado; d - parte do grão de pólen de onde foram retiradas as medidas para fins taxonômicos; e - grãos de pólen corados com a solução de Carmin Acético para o teste de viabilidade; f - corados com a solução de Alexander; g - ao lado de um grão de pólen viável apresenta-se um grão de pólen inviável com sua parede esta rompida e o conteúdo celular extravasado; h - grãos de pólen corados com Sudan IV mostrando que em sua parede esta a secreção lipídica denominada de polenkitt(seta); i - grãos de pólen corados com solução tetrazólio

5.6. CONCLUSÕES

- Através dos estudos morfológicos notou-se que não há diferença no desenvolvimento das flores femininas e masculinas do pinhão manso quando os acessos foram comparados (Minas Gerais, Mato Grosso do Sul e São Paulo) a qual seria utilizada na identificação dos diferentes acessos presentes no Brasil. Outros estudos devem ser realizados para comparar se há diferença entre os acessos nacionais e os internacionais;

- A descrição detalhada dos órgãos florais poderá ser utilizada em estudos posteriores para a identificação e trabalhos de taxonomia envolvendo a espécie;

- O estudo dois, forneceu dados de viabilidade polínica de *Jatropha curcas* L. e avaliou a validade de testes colorimétricos como estimativa de viabilidade polínica indicando que os acessos Mato Grosso do Sul e Minas Gerais podem ser utilizados em programas de melhoramento genético como parentais masculinos;

- Os testes com os corantes Alexander e carmim acético, são estimativas ineficientes de viabilidade polínica, embora possam ser usados com eficácia para determinar componentes celulares e a integridade do grão de pólen. Já o TTC mostrou-se uma ferramenta confiável como estimativa rápida de viabilidade polínica.

6. REFERÊNCIAS

ADEBOWALE, K.O.; ADEDIRE, C. O. Chemical composition and insecticidal properties of the underutilized *Jatropha curcas* seed oil. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 10 p. 901-906, 2006.

AKBAR, E.; YAAKOB, Z.; KAMARUDIN, S.K.; ISMAIL, M.; SALIMON, J. Characteristic and composition of *Jatropha curcas* oil seed from Malaysia and its potencial as biodiesel feedstock. **European Journal of Scientific Research**, Oxford, v. 29 p. 396-403, 2009.

AIRY SHAW, H.K. The Euphorviaceae of Siam. **Kew Bulletin**, London, v. 26 p. 191-363, 1972;

ALEXANDER, M.P. A versatile stain for pollen, fungi, yeast and bacteria. **Stain Technology**, Baltimore, v. 55, p. 13-18, 1980.

ARMBRUSTER, W.S.; MCCORMICK, K.D. Dielforaging patterns of male Euglossine bees: Ecological causes and evolutionary response by plants. **Biotropica**, Washington, DC, v. 22, p. 160-171, 1990.

ARMBRUSTER, W.S.; STEINER, K.E. Pollination ecology of four *Dalechampia* species (Euphorbiaceae) in Northern Natal, South Africa. **American Journal of Botany**, New York, v. 79, p. 306-313, 1992.

ARMBRUSTER, W.S.; WEBSTER, G.L. Pollination of two species of *Dalechampia* (Euphorbiaceae) in Mexico by Euglossine bees. **Biotropica**, Washington, DC, v. 11, p. 278-283, 1979.

ARMBRUSTER, W.S.; HERZIG, A.L.; CLAUSEN, T.P. Pollination of two sympatric species of *Dalechampia* (Euphorbiaceae) in Suriname by male Euglossine bees. **American Journal of Botany**, New York, v. 79, p. 1374-1381, 1992.

BAÉZ, P.; RIVEROS, M.; LEHNEBACH, C. Viability and longevity of pollen of *Nothofagus* species in south Chile. **New Zealand Journal of Botany**, Wellington, v. 40, p. 671-678, 2002.

BAKER, H.G.; BAKER, I. Starch in angiosperm pollen grains and its evolutionary significance. **American Journal of Botany**, New York, v. 66, p. 591-600, 1979.

BARROS, L.M.; PAIVA, J.R.; CRISÓSTOMO, J.R.; CAVALCANTI, J.J. Hibridação em caju. In: BORÉM, A. **Hibridação artificial de plantas**. Viçosa: UFV, 1999. p. 191-220.

BARROSO, G.M. **Sistemática de angiospermas no Brasil**. São Paulo: Edusp, 1991.

BARROSO, G.M.; MORIN, M.P.; PEIXOTO, A.L.; ICHASO, C.L.F. **Frutos e sementes -** morfologia aplicada à sistemática de dicotiledôneas. Viçosa: UFV, 1999. 443 p.

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**, Wageningen, v. 156, p. 375-386, 2007.

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 relationship between *Jatropha curcas* L. germplasm from different countries. **Plant Science**, Amsterdam, v. 6, p. 812-823, 2009;

BECKER, J.; VOS, P.; KUIPER, M.; SALAMINI, F.; HEUN, M. Combined mapping of AFLP and RFLP markers in barley. **Molecular and General Genetics**, Berlin, v. 249, p. 65-73, 1995.

BELTRÃO, N.E. de M. **Considerações gerais sobre o pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) e a necessidade urgente de pesquisas, desenvolvimento e inovações tecnológicas para esta planta nas condições brasileiras**. Campina Grande: UFPB, 2006. 3 p.

BERG, R.Y. Fruit, seed, and myrmecochorous dispersal in *Micrantheum* (Euphorbiaceae). **Norwegian Journal of Botany**, Oslo, v. 22, p. 173-194, 1975.

BEYHAUT, R. **Estúdio comparado de dos técnicaspara viabilidad de polen en *Vitis vinifera***. Montevideo: Faculdad de Agronomia, 1988. (Notas Técnicas, 5).

BHATTACHARYA, A.; DATTA, K.; DATTA, S.K. Floral biology, floral resource constraints and pollination limitation in *Jatropha curcas* L. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, New York, v. 8, p. 456-460, 2005.

BLANCO, C. G. de. **Guignardia citricarpa Kiely**: análise genética, cariotípica e interação com o hospedeiro. 1999. 200 f. Tese (Doutorado em Agronomia – Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo Piracicaba, 1999.

BOLAT, I.; PIRLAK, L. An investigation on pollen viability, germination and tube growth in some stone fruits. **Turkish Journal of Agriculture and Forestry**, Ankara,Turkey, v. 23, p. 383-388, 1999.

BREWBAKER, J.L.; KWACK, B.H. The essential role of calcium ion in pollen germination and pollen tube growth. **American Journal of Botany**, New York, v. 50, p. 859-865, 1963.

CERVERA, M.T.; CABEZAS, J.A.; SANCHA, S.J.; MARTINEZ de TODA, F.; MARTINEZ ZAPATER, J.M. Application of AFLPs to the characterization of gravepine Vitis vinifera L. genetic resources. A case study with accessions from Rioja (Spain). **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 97, p. 51-59, 1998.

CHANG-WEI, L.; KUN, L.; YOU, C.; YONG-YU, S.; WEN-YUN, Y. Pollen viability, stigma receptivity and reproductive features of *J. curcas* L. (Euphorbiaceae). **Journal of Northwest Plant**, Beijing, v. 27, n. 10, p. 1994–2001, 2007.

CHRISTO, D. de. **Variabilidade genética e diferenciação molecular de isolados endofíticos e patogênicos de Guignardia spp e Phyllosticta sp.** 2002. 78 f. Dissertação (Mestrado em Genética) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2002.

CRESTES, S.; TULMANN NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrilamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology Reporter**, Heidelberg, v. 19, p. 299-306, 2001.

CRUZ, R.P.; MILACH, S.C.K. Análise de RAPD. In: MILACH, S. **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre: Sandra Milach Editora, 1998. p. 107-116.

DAFNI, A. **Pollination ecology**: a practical approach. New York: University Press, 1992.

DALZOTO, P.R.; GLIENKE-BLANCO, C.; KAVA-CORDEIRO, V.; ARAÚJO, W.L.; AZEVEDO, J.L. RAPD analyses of recombination processes in the entomopathogenic fungus Beauveria bassiana. **Mycological Research**, Cambridge, v. 107, p. 1069-1074, 2003.

DAMIÃO FILHO, C.F. **Morfologia vegetal.** Jaboticabal: FUNEP, UNESP, 1993. 243 p.

DEHGAN, B. Phylogenetic significance of interspecific hybridization in *Jatropha* (Euphorbiaceae). **Systematic Botany**, Notre Dame, v. 9, n. 4, p. 467-478, 1984.

DEHGAN, B.; WEBSTER G.L. Morphology and intrageneric relationship of the genus *Jatropha* (Euphorbiaceae). **University of California Publications in Botany**, Berkeley, v. 74, p. 12-24, 1979.

DEVAPPA, R.K.; SWAMYLINGAPPA, B. Biochemical and nutritional evaluation of Jatropha protein isolate prepared by steam injection heating for reduction of toxic and antinutricional factors. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 88, p. 911-919, 2008.

DHILLON, R.S.; HOODA, M.S.; HANDA, A.K.; AHLAWAT, K.S.; KUMAR, Y.; SUBHASH, B.; SINGH, N. Clonal propagation and reproductive biology in *Jatropha curcas* L. **Indian Journal of Agroforestry**, Raipur, India, v. 8, n. 2, p. 18–27, 2006.

DIVAKARA, B.N.; UPADHYAYA, S.P.; WANI, C.L.; LAXMIPATHI GOWDA. Biology and genetic improvement of *Jatropha curcas* L.: A review. **Applied Energy**, London, v. 87, p. 732-743, 2010.

DONINI, P.; ELIAS, M.L.; BOURGOURD, S.M.; KOEBNER, R.M.D. AFLP fingerprinting reveals pattern differences between template DNA extracted from diferent plant organs. **Genome**, Ottawa, v. 40, p. 521-526, 1997.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, New York, v. 12, n. 1, p. 13-15, 1990.

DRUMMOND, O.A.; PURCINO, A.A.C.; CUNHA, L.H.S.; VELOSO, J.M. **Cultura do pinhão manso**. Belo Horizonte: EPAMIG, 1984. (Pesquisando, 131).

ELISIÁRIO, P.; JUSTO, E.; LEITÃO, J. Identification of mandarin hybrids by isozyme and RAPD analysis. **Scientia Horticulture**, Amsterdam, v. 81, p. 287-299, 1999.

ERDTMAN, G. The acetolysis method. A revised description. **Svensk Botanisk Tidskrift**, Uppsala, Sweden, v. 54, p. 561-564, 1960.

EUROPEAN PATENT OFFICE (Munich, Germany). Zabeau, M.; Vos, P. **Selective restriction fragment amplification**: a general method for DNA fingerprinting. European Patent Application Nº 0534858 A1. 1993.

FAIRLESS, D. The little shrub that could maybe. **Nature**, London, v. 449, p. 652-655, 2007. doi: 10.1038/449652a.

FUNDAÇÃO CENTRO TECNOLÓGICO DE MINAS GERAIS. **Programa Energia**: produção de combustíveis líquidos a partir de óleos vegetais. Belo Horizonte: CETEC-MG, 1983a. 152 p. v. 1: Estudo de oleaginosas nativas de Minas Gerais.

FUNDAÇÃO CENTRO TECNOLÓGICO DE MINAS GERAIS. **Programa Energia:** produção de combustíveis líquidos a partir de óleos vegetais. Belo Horizonte: CETEC-MG, 1983b. 65 p. v. 2: Transesterificação de óleos vegetais.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2. ed. Brasília: EMBRAPA, CENARGEN, 1995.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3. ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220 p.

GALETTA, G.J. Pollen and seed management. In: MOORE, J.N.; JANIK, J. (Ed.). **Methods in fruit breeding**. Indiana: Purdne University Press, 1983. p. 23-47.

GANESH RAM, S.; PARTHIBAN, K.T.; SENTHIL, K.R.; THIRUVENGADAM, V.; PARAMATHMA, M. Genetic diversity among *Jatropha* species as revealed by RAPD markers. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v. 50, p. 75-82, 2008.

GARCIA, A.A.F.; BENCHIMOL, L.L.; BARBOSA, A.M.M.; GERALDI, I.O.; SOUZA JUNIOR, C.L.; de SOUZA, A.P. Comparison of RAPD, RFLP, AFLP and SSR markers for diversity studies in tropical maize inbred lines. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 27, p. 579-588, 2004.

GARCIA-MAS, J.; OLIVER, M.; GÓMEZ-PANIAGUA, H.; De VICENTE M.C. Comparing AFLP, RAPD and RFLP markers for measuring genetic diversity in melon. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 101, p. 860-864, 2000.

GERBER, S.; MARIETTE, S.; STREIFF, R.; BODÉNÈS, C.; KREMER, A. Comparison of microssatelite and amplified fragment length polymorphism markers for parental analyses. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 9, p. 1037-1048, 2000.

GINWAL, H.S.; RAWAT, P.S.; SRIVASATAVA, R.L. Seed source variation in growth performance and oil yield of *Jatropha curcas* Linn. in central India. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 53, p. 186-192, 2004.

GOMES, J.E.; PAVANI, M.C.M.D.; PERECIN, D.; MARTINS, A.B.G. Morfologia floral e biologia reprodutiva de genótipos de aceroleira. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 58, n. 3, p. 519-523, 2001.

GLIENKE, C. **Variabilidade genética no fungo endófito Guignardia citricarpa Kiely detectada por RAPD**. 1995. 115 f. Tese (Mestrado em Ciências Biológicas - Genética) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1995.

GLIENKE-BLANCO, C.; AGUILAR-VILDOSO, C.I.; VIEIRA, M.L.C.; BARROSO, P.A.V.; AZEVEDO, J.L. de. Genetic variability in the endophytic fungus Guignardia citricarpa isolated from citrus plants. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 25, n. 2, p. 251-255, 2002.

GRANER, E.A. Notas sobre florescimento e frutificação da mandioca. **Bragantia**, Campinas, v. 2, p. 1-2, 1942.

GUPTA, S.; SRIVASTAVA, M.; MISHRA, G.P.; NAIK, P.K.; CHAUHAN, R.S.; TIWARI, S.K.; KUMAR, M.; SINGH, R. Analogy of ISSR and RAPD markers for comparative analyses of genetic diversity among different *Jatropha curcas* genotypes. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 7, p. 4230-4243, 2008.

HARRISON, R.E.; LUBY, J.J.; FURNIER, G.R.; HANCOCK, J.F. Morphological and molecular variation among populations of octoploid Fragaria virginiana and F.

choliensis (Rosaceae) from North America. **American Journal of Botany**, New York, v. 84, p. 612-620, 1997.

HE, W.; GUO, L.; WANG, L.; YANG, W.; TANG, L.; CHENG, F. ISSR analyses of genetic diversity of *Jatropha curcas* L. **Chinese Journal of Applied and Environmental Biology**, Sichuan, China, v. 13, n. 4, p. 466-470, 2007.

HELLER, J. **Physical nut (*Jatropha curcas* L.)**: promoting the conservation and use of under utilizaed and neglected crops. 1. Gatersleben: Institute of Planta Genetics and Crop Plant Research; Rome: International Plant Genetic Resources Institute, 1996. 66 p.

HESLOP-HARRISON, J.; HESLOP-HARRISON, Y. Evaluation of pollen viability by enzymatically induced fluorescence; intracellular hydrolysis of fluorescein diacetate. **Stain Technology**, Baltimore, v. 45, p. 115-120, 1970.

HUANG, Z.; ZHU, J.; MU, X.; LIN, J. Pollen dispersion, pollen viability and pistil receptivity in *Leymus chinensis*. **Annals of Botany**, Oxford, v. 93, p. 295-301, 2004.

JOLY, C.B.; LEITÃO-FILHO, H.F.; SILVA, S.M. O patrimônio florístico. In: CÂMARA, I.G. (Ed.). **Mata Atlântica**. São Paulo: SOS Mata Atlântica, 1991. p. 96-128.

JONGSCHAAP, R.E.E.; CORRÉ, W.J.; BINDRABAN, P.S.; BRANDENBURG, W.A. **Claims and facts on *Jatropha curcas* L.** Wageningen: Plant Research International, 2007. 42 p.

KARP, A.; SEBERG, O.; BUIATTI, M. Molecular Techniques in the Assessment of Botanical Diversity. **Annals of Botany**, Oxford, v. 78, p. 143-149, 1996.

KARP, A.; EDWARDS, K. DNA markers: a global overview: In: ANOLLES, G.C.; GRESSHOFF, P.M. (Ed.). **DNA markers**: protocols, applications and overviews. New York: Willy-Liss, 1998. p. 1-14.

KAUSHIK, N.; ROY, S.; BISWAS, G. C. Screening of Indian germplasm of *Jatropha curcas* for selection of high oil yielding plants. **Indian Journal of Agroforestry**, Raipur, India, v. 8 p. 54-57, 2006.

KAUSHIK, N.; KUMAR, K.; KUMAR, S.; KAUSHIK, N.; ROY, S. Genetic variability and divergence studies in seed traits and oil content of *Jatropha* (*Jatropha curcas* L.) accessions. **Biomass and Bioenergy**, Amsterdam, v. 31 p. 49-502, 2007.

KEARNS, C.A.; INOUYE, D.W. **Techniques for pollination biologist**. Niwot: University of Colorado, 1993.

KING, J.R. The peroxidase reaction as an indicator of pollen viability. **Stain Technology**, Baltimore, v. 35, p. 225-227, 1960.

KYWE, T.T.; OO, M.M. Production of biodiesel from Jatropha Oil (*Jatropha curcas*) in pilot plant. **Proceedings of World Academy of Science, Engeneering and Technology**, Blackpool, UK, v. 38, p. 2070-3740, 2009.

LAGÔA, A.M.M.A.; PEREIRA, M.F.D.A. Envolvimento do tegumento no controle da germinação de sementes de *Ricinus communis* L. **Revista de Biologia**, São Paulo, v. 14, p. 213-220, 1989.

LANDES, M. Seed development in *Acalypha rhomboidea* and some other Euphorbiaceae. **American Journal of Botany**, New York, v. 33, p. 562-568, 1946.

LIN, J-J.; KUO, J.; MA, J. A PCR-based DNA fingerprinting technique: AFLP for molecular typing of bacteria. **Nucleic Acids Research**, London, v. 24, p. 3649-3650, 1996.

LIN, J.; YAN, F.; TANG, L.; CHEN, F. Antitumor effects of curcin from seeds of *Jatropha curcas*. **Acta Pharmacologica Sinica**, Beijing, v. 24, n. 3, p. 241-246, 2003.

LIU, H.F.; KIRCHOFF, B.K.; WU, G.J.; LIAO, J.P. Microsporogenesis and male gametogenesis in *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae). **Journal of Torrey Botanical Society**, Lawrence, v. 134, n. 3, p. 335-343, 2007.

LOPES, R.; LOPES, M.T.G.; FIGUEIRA, A.V.O.; CAMARGO, L.E.A.; FUNGARO, M.H.P.; CARNEIRO, M.S.; VIEIRA, M.L.C. Marcadores moleculares dominantes (RAPD e AFLP). **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, DF, v. 29, p. 56-60, 2002.

LUSH, W.M. Winter chemotropism and pollen tube guidance. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 4, p. 413-418, 1999.

MARTIN, G.; MAYEUX, A. Réflexions sur les cultures oléagineuses énergétiques. II – Le Pourghère (*Jatropha curcas* L): um carburant possible. **Oléagineux**, Paris, v. 39, p. 283-287, 1984.

MARTINS, M.E.; PRERA, L.E.H.; KAGEYAMA, P.Y. **Manejo de pólen de *Pinus* para fins de melhoramento genético**. Piracicaba: IPEF, 1981. (Circular Técnica, 18).

McCLELLAND, M.; WELSH, J. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**, London, v. 18, n. 24, p. 7213-7218, 1990.

McVAUGH, R. The genus *Jatropha* in América: Principal Inter-generic Groups. **Bulletin of the Torrey Botanical Club,** New York, v. 72, p. 271-294, 1945.

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

MONTES, L.R.; AZURDIA, C.; JONGSCHAAP, R.E.E.; Van LOO, B.E.; VISSER, R.; MEJIA, L. Global evaluation of genetic variability in *Jatropha curcas*. In: WAGENING UNIVERSITY PLANT BREEDING RESEARCH DAY, 2008. **Poster**. Wageningen, 2009.

MUELLER, U.G.; WOLFENBARGER, L.L.R. AFLP genotyping and fingerprinting. **Trends in Ecology & Evolution**, Cambridge, v. 14, n. 10, p. 389-394, 1999.

MULUGETA, D.; MAXWELL, B.D.; FAY, P.K.; DYER, W.E. Kochia (*Kochia scoparia*) pollen dispersion, viability and germination. **Weed Science**, Ithaca, v. 42, p. 548-552, 1994.

MÜNCH, E.; KIEFER, J.F. Purging nut (*Jatropha curcas* L.) multiple use plant as a source of fuel in the future. **Schriftenreihe der Gesellschaft fur Technishe Zusammenarbeit,** Stuttgart, v. 209, n. 209, p. 32, 1989.

MURO, A.M.; MEHTA, S.; MOORE, D. The use of amplified fragment length polymorphism for molecular analysis of *Beauveria bassiana* isolates from Kenya and other

countries, and their correlation with host and geographical origin. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 229, p. 249-257, 2003.

NAPOLEÃO, B.A. Biodiesel: alternativa econômica, social e ambiental para o Brasil. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 26, n. 229, p. 3, 2005.

NICESE, F.P.; HORMAZA, J.I.; McGRANAHAN, G.H. Molecular characterization and genetic relatedness among walnut (Juglans regia L.) genotypes based on RAPD markers. **Euphytica**, Wageningen, v. 101, p. 199-206, 1998.

OLIVEIRA, P.P.; SANTOS, F.A.R. Morfologia polínica do gênero *Croton* L. (Euphorbiaceae) dos inselbergs da região de Milagres (Bahia – Brasil). **Revista Universidade de Guarulhos. Geociências**, Guarulhos, v. 5, p. 212-215, 2000.

PANT, K.S.; KHOSALA, V.; KUMAR, D.; GAIROLA, S. Seed oil content variation in *J. curcas* Linn. In different altitudinal ranges and site conditions in H. P. India. **Lyonia**, Honolulu, v. 11, n. 2, p. 31-34, 2006.

PAMIDIAMARRI, S.D.V.; SINGH, S.; MASTAN, S.G.; PANTEL, J.; REDDY, M.P. Molecular characterization and identification of markers for toxic and non-toxic varieties of *Jatropha curcas* L. using RAPD, AFLP and SSR markers. **Molecular Biology Reports**, Dordrecht, v. 36 p. 1357-1364, 2008.

PAMIDIAMARRI, S.D.V.; PANDYA, N.; REDDY, M.P.; PADHAKRISHNAN, 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, 2009.

PAOLI, A.A.S.; FREITAS, L.; BARBOSA, J.M. Caracterização morfológica dos frutos, sementes e plântulas de *Croton floribundus* Spreng. e de *Croton urucurana* Baill. (*Euphorbiaceae*). **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, DF, v. 17, p. 57-68, 1995.

PEIXOTO, A.R. **Plantas oleaginosas arbóreas**. São Paulo: Nobel, 1973. 284 p.

PLINE, W.A.; EDMISTEN, K.L.; OLIVER, T.; WILCUT, J.W.; WELLS, R.; ALLEN, N.S. Use of digital image analysis, viability stains, and germination assays to estimate

conventional and glyphosate-resistant cotton pollen viability. **Crop Science**, Madison, v. 42, p. 2193-2200, 2002.

POPLUECHAI, S.; BREVIARIO, D.; MULPURI, S.; MAKKAR, H.P.S.; RAORANE, M.; REDDY, A.R.; PALCHETTI, E.; GATEHOUSE, A.M.R.; SYERS, J.K.; O'DONNELL, A.G.; KOHLI, A. Narrow genetic and apparent phenetic diversity in Jatropha curcas: initial success with generating low phorbol ester interspecific hybrids. **Nature Precedings**, London, 2009. hdl:10101/npre.2009.2782.1. Disponível em: http://precedings.nature.com/documents/2782/version/1.

PRABAKARAN, A.J.; SUJATHA, M. *Jatropha tanjorensis* Ellis & Saroja, a natural interespecific hybrid occuring in Tamil Nadu, Índia. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v. 46, p. 213-218, 1999.

PUNT, W. Pollen morphology of the *Euphorbiaceaae* with special reference to taxonomy. **Wentia**, Amsterdam, v. 7, p. 1-116, 1962.

QING, Y.; PING, P.D.; BIAO, D.Z.; LIANG, W.Z.; XIANG, S.Q. Study on pollination biology of *Jatropha curcas* (*Euphorbiaceae*)**. Journal of South China Agricultural University**, Beijing, v. 28, n. 3, p. 62–66, 2007.

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

RAM, S.G.; PARTHIBAN, K.T.; KUMAR, R.S.; THIRUVENGADAM, V.; PARAMATHMA, E.M. Genetic diversity among *Jatropha* species as revealed by RAPD markers. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v. 55, p. 803-809, 2008.

RANADE, S.A.; SRIVASTAVAA, A.O.; RANAB, T.S.; SRIVASTAVAA, J.; TULIA, R. Easy assessment of diversity in *Jatropha curcas* L. plants using two single-primer amplification reaction (SPAR) methods. **Biomass and Energy**, Kidlington, v. 32, p. 533-540, 2008.

RAO, G.R.; KPRWA, G.R.; SHANKER, A.K.; RAMAKRISHNA, Y.S. Genetic associations, variability and diversity in seed charadters, growth, reproductive phenology and yield in *Jatropha curcas* (L.). **Trees: Structure and Function**, Heidelberg, v. 22 p. 697-709, 2008.

REDDY, M.P.; BOSSDORF, O.; PATOLIA, J.S.; GHOSH, A. Genetic improvement of *J. curcas* adaptability and oil yield. In: FACT SEMINANAR ON *J. CURCAS* L., AGRONOMY AND GENETICS, 2007, Wageningen. Wageningrn: FACT Foundation, 2007.

RIGAMOTO, R.R.; TYAGI, A.P. Pollen fertility status in coastal plant species of Rotuma Island. **The South Pacific Journal of Natural Science**, Suva, Fiji, v. 20, p. 30-33, 2002.

RODRÍGUEZ-GARCIA, M.I.; M'RANI-ALAOUI, M.; FERNÁNDEZ, M.C. Behavior of storage lipids during development and germination of olive (*Olea europaea* L.) pollen. **Protoplasma,** Leipzig, v. 221, p. 237-244, 2003.

RODRIGUEZ-RIANO, T.; DAFNI, A. A new procedure to asses pollen viability. **Sexual Plant Reproduction**, Berlin, v. 12, p. 241-244, 2000.

ROSCOE, R. **Pinhão manso**: cultura agrícola viável ou planta promissora? Curitiba: Biodieselbr, 2007. Disponível em: http://www.pinhaomanso.com.br/noticias/jatropha/pinhao_manso_cultura_agricola_viavel_planta_promissora_13_03_07.html. Acesso em: 30 dez. 2009.

ROSENDAHL, S.; TAYLOR, J.W. Development of multiple genetic markers for studies of genetic variation in arbuscular mycorrhizal fungi using AFLP^{TM}. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 6, p. 821-829, 1997.

ROUBIK, D.W.; MORENO P., J.E. **Pollen and spores of Barro Colorado Island**. St. Louis: Missouri Botanical Garden, 1991. 268 p. (Monographs in Systematic Botany, 36).

SAHAR, N.; SPIEGEL-ROY, P. *Citrus* pollen storage. **HortScience**, St. Joseph, v. 15, p. 81-82, 1984.

SAIKI, R.K.; SCHARF, S.J.; FALOONA, F.; MULLIS, K.B.; HORN, G.T.; ERLICH, H.A.; ARNHEIM, N. Enzymatic amplification of q-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, Washington, DC, v. 230, p. 1350-1354, 1985.

SALGADO-LABOURIAU, M.L. **Contribuição à palinologia dos cerrados**. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, 1973.

SAS INSTITUTE INC. **SAS/STAT user´s guide**: statistics. Version 8 ed. Cary, NC, 2000.

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

SENTHIL KUMAR, R.; PARTHIBAN, K.T.; GOVINDA RAO, M. Molecular characterization of *Jatropha* genetic resources through inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. **Molecular Biology Reports**, Dordrecht, v. 36, n. 7, p. 1951-1956, 2009

SHANKER, C.; DHYANI, S.K. Insect pests of *Jatropha curcas* L. and the potential for their management. **Current Science**, Bangalore, v. 91, n. 2, p. 162-163, 2006.

SINGH, R.P. Structure and development of seeds in Euphorbiaceae: *Ricinus communis* L. **Phytomorphology**, Delhi, v. 4, p. 118-123, 1954.

SINGH, R.P. Structure and development of seeds in *Euphorbia helioscopia*. **Botanical Magazine**, Tokyo, v. 82, p. 287-293, 1969.

SINGH, R.P.; CHOPRA, S. Structure and development of seeds in *Croton bonplandianum*. **Phytomorphology**, Delhi, v. 20, p. 83-87, 1970.

SINGH, I.D. New leaf spot diseases of two medicinal plants. **Madras Agricultural Journal**, Tamil Nadu, India, v. 70, n. 7, p. 490, 1983.

SINGH, P.; SINGH, S.; MISHRA, S.P.; BHATIA, S.K. Molecular characterization of genetic diversity in *Jatropha curcas* L. **Genes, Genomes and Genomics**, Ikenobe, Japan, v. 4, p. 1-8, 2010. Special Issue I.

SILVA, R.M.; BANDEL, G.; FARALDO, M.I.F.; MARTINS, P.S. Biologia reprodutiva de etnovariedades de mandioca. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 58, n. 1, p. 101-107, 2001.

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

SOUZA, M.M.; PEREIRA, T.N.S.; MARTINS, E.R. Microsporogênese e microgametogênese associadas ao tamanho do botão floral e da antera e viabilidade polínica em maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 26, p. 1209-1217, 2002.

SU, 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.

SUBRAMANIAN, K.A.; SINGAL, S.K.; SAXENA, M.; SINGHAL, S. Utilization of liquid biofuels in automotive diesel engines: Na Indian perspective. **Biomass and Bioenergy**, Amsterdam, v. 29, p. 65-72, 2005.

SUDHEER PAMIDIMARRI, D.V.N.; MASTAN, S.G.; RAHMAN, H.; REDDY, M.P. Molecular characterization and genetic diversity analysis of *Jatropha curcas* L. in India using RAPD and AFLP analysis. **Molecular Biology Reports**, Dordrecht, v. 37, n. 5, p. 2249-2257, 2010..

SUJATHA, M.; REDDY, T.P.; MAHASI, M.J. Role of biotechnological intervenetion in the improvement of castor (*Ricinus communis* L.) and *Jatropha curcas* L. **Biotechnological Advances**, Oxford, v. 29, p. 65-72, 2008.

SUNIL, N.; VARAPRASAD, K.S.; SIVARAJ, N.; SURESH KUMAR, T.; ABRAHAM, B.; PRASAD, R. B. N. Assessing Jatropha curcas L. germplasm in-situ – A case study. **Biomass and Bioenergy**, Amsterdam, v. 32, n. 3, p. 198-202, 2008.

STANLEY, R.G.; LINSKENS, H.F. **Pollen biology biochemistry management**. Berlin: Springer-Verlag, 1974. 307 p.

TATIKONDA, L.; WANI, S.P.; KANNAN, S.; THAKUR, B.N.; SREEDEVI, K.; HOISINGTON, D.A.; DEVI, P.; VARSHNEY, R.K. AFLP-based molecular characterization

of an elite germplasm collection of *Jatropha curcasI* L., a biofuel plant. **Plant Science**, Amsterdam, v. 176, p. 505-513, 2009.

TAYLOR, L.P.; HEPLER, P.K. Pollen germination and tube growth. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 48, p. 461-491, 1997.

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

THOMAS, R.; SAH, N.K.; SHARMA P.B. Therapeutic biology of *Jatropha curcas*: a mini review. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, Sharjah, U.A.E., v. 9, p. 315-324, 2008.

TRAVIS, S.; MASCHINSKI, J.; KEIM, P. An analysis of genetic variation in Astragalus cremnophylax var. cremnophylax, a critically endangered plant, using AFLP markers. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 5, p. 735-745, 1996.

TOKUOKA, T.; TOBE, H. Ovules and seeds in *Crotonoideae* (*Euphorbiaceae*): structure and systematic implications. **Botanische Jahrbücher für Systematik**, Stuttgart, v. 120, p. 165-186, 1998.

TOKUOKA, T.; TOBE, H. Ovules and seeds in *Euphorbioideae* (*Euphorbiaceae*): structure and systematic implications. **Journal of Plant Research**, Sendai, v. 115, p. 361-374, 2002.

TOKUOKA, T.; TOBE, H. Ovules and seeds in *Acalyphoideae* (*Euphorbiaceae*): structure and systematic implications. **Journal of Plant Research**, Sendai, v. 116, p. 355-380, 2003.

TROLL, W. Über antherenbau, pollen and pollination von *Galanthus* L. **Flora**, Jena, v. 123, p.321-342, 1928.

VEDANA, U. O futuro do pinhão manso (*Jatropha curcas*). Curitiba: Biodieselbr, 2006. Artigo em hypertexto. Disponível em: <http://www.biodieselbr.com/blog/2006/10/o-futuro-do-pinhao-manso-jatropha -curcas/>. Acesso em: 30 nov. 2009.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; VAN DE LEE, T.; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; EUROPEAN, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, London, v. 23, p. 4407-4414, 1995.

WEBSTER, G. L Classification of the *Euphorbiaceae*. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, St. Louis, v. 81, p. 3-32, 1994.

WELSH, J.; McCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**, London, v. 18, p. 7213-7218, 1990.

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

WINFIELD, M.O.; ARNOLD, G.M.; COOPER, F.; LERAY, M.; WHITE, J.; KARP, A.; EDWARDS, K.J. A study of genetic diversity in Populus nigra subsp. betulifolia in the Upper Severn area of the UK using AFLP markers. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 7, n. 1, p. 3-10, 1998.

YANG, X; QUIROS, C. Identification and classification of celery cultivars with RAPD markers. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 86, p. 205-212, 1993.

ZHU, J.; GALE, M.D.; QUARRIE, S.; JACKSON, M.T.; BRYAN, G.J. AFLP markers for the study of rice biodiversity. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 96, p. 602-611, 1998.