KLEBER ALVES GOMES

Diversidade alélica, metabólica e físico-química da biossíntese de ácidos graxos e ésteres de forbol em diferentes genótipos de *Jatropha curcas* L.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantã/IPT, para obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

São Paulo
2014

KLEBER ALVES GOMES

Diversidade alélica, metabólica e físico-química da biossíntese de ácidos graxos e ésteres de forbol em diferentes genótipos de *Jatropha curcas* L

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantã/IPT, para obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Dra. Marie-Anne Van Sluys

Versão Original

São Paulo
2014

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Gomes, Kleber Alves.

Diversidade alélica, metabólica e físico-química da biossíntese de ácidos graxos e ésteres de forbol em diferentes genótipos de *Jatropha curcas* L. / Kleber Alves Gomes. -- São Paulo, 2014.

Orientador: Profa. Dra. Marie Anne Van Sluys.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Biotecnologia de plantas e melhoramento genético.

Versão do título para o inglês: Allelic, metabolics and physicochemical diversity of fatty acids and phorbol esters biosynthesis in different *Jatropha curcas* L. genotypes.

1. Biotecnologia de plantas 2. Melhoramento genético vegetal 3. Diversidade genética 4. Genótipos 5. Biodiesel I. Sluys, Profa. Dra. Marie Anne Van II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB0148/2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Kleber Alves Gomes.

Título da Tese: Diversidade alélica, metabólica e físico-química da biossíntese de ácidos graxos e ésteres de forbol em diferentes genótipos de *Jatropha curcas* L.

Orientador(a): Profa. Dra. Marie Anne Van Sluys.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

“Dedicar, é um verbo transitivo indireto
que significa: oferecer, doar-se, sacrificar-
se por, consagrar, tributar, devotar,
destinar...”

Ninguém me ama mais neste mundo do
que meus pais. A este amor devo tributar
todos os meus sacrifícios. Dedico esta
tese a vocês, Evandro e Eulina por sua
entrega, confiança e apoio incondicional
neste desafio.

À minha irmã Karine e minha sobrinha
Sabrina pelo imenso amor, apoio e
carinho de sempre.

Às minha avó Rosa pelo seu amor e
confiança.

À Silvia Blanco, pela sua confiança e
lealdade e por estar ao meu lado em
todas as dificuldades.

Obrigado!

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço à Deus, porque tudo vem Dele, até mesmo a ciência. Ele esteve comigo em todas as dificuldades que passei por aqui, à cada instante me conduzindo, me protegendo.

À profa. Dra. Marie-Anne pela orientação, pela oportunidade de trabalho em seu grupo de pesquisa, pelo voto de confiança, pelo acompanhamento científico do projeto.

À profa. Dra. Daniela de Argollo Marques por ter sido a âncora chave na co-orientação deste trabalho. Por ter construído e acompanhado cada ponto da tese com maestria com suas conversas e conselhos, e por estar sempre disponível. Enfim, por todo carinho e suporte tanto científico quanto pessoal e, sobretudo pela confiança depositada em mim e no sucesso deste trabalho.

Ao prof. Dr. Nicolas Carels pela indicação da Marie, pela co-orientação informal, pelo seu apoio em todos os momentos e em todos os meus projetos desde o mestrado. E por estar ajudando a construir minha formação e autonomia científica.

Ao prof. Dr. Carlos Augusto Colombo por abrir as portas do Laboratório de Diversidade Genética Vegetal do IAC para realização dos experimentos de extração de ácidos nucleicos e expressão gênica, por me apoiar e me incentivar em todos os momentos desta pesquisa e pela confiança depositada.

À profa Dra. Haiko Enok Sawazaki do IAC pela abertura do seu laboratório para realização de alguns ensaios, pelas discussões científicas.

À profa Dra. Cássia Regina Limonta Carvalho do laboratório de fitoquímica (IAC) pela colaboração na extração de óleo com aparato soxhlet.

À profa Dra. Patrícia Helena Lara dos Santos Matai do departamento de Engenharia Química da USP pela colaboração nas análises de Poder Calorífico do óleo.

Ao prof. Dr. Augusto Câmara Neiva do departamento de Engenharia Química da USP, juntamente com seu técnico Antonio Carlos pela colaboração na realização dos experimentos de determinação do Poder Calorífico do óleo em seu laboratório.

Ao Prof. Dr. Paulo Arruda do Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG) da UNICAMP pela colaboração na quantificação de ácidos nucleicos.

Ao Prof. Dr. Gonçalo coordenador do Laboratório de Genômica e Expressão Gênica da UNICAMP e sua aluna Renata pela colaboração na liofilização das amostras.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da Bolsa e pelo financiamento das Etapas de Campo do trabalho com a concessão do auxílio PROAP.

À Petrobras pelo financiamento do projeto de melhoramento genético do pinhão-mansão do IAC.

Ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia, mais especificamente, ao Marcos, à Fabia e a Eliane pela precisão e coerência nos serviços prestados, e mais do que isso, pela amizade construída.

Aos professores dos programas de pós-graduação da USP pelos ensinamentos (Dr. Diogo Meyer, Dra. Viviane Maimoni, Dr. Ivo Lebrun, Dra. Patrícia Matai, Dr. Massuo Kato e Dr. Silas Villas-Bôas).

Aos professores do Instituto Agrônomo de Campinas pelos ensinamentos (Walter Siqueira e Jorge Mondego).

Ao grupo GATE Lab (Bruno Karolski, Mayra Akemy, Natália de Setta, Érica de Jesus, Danielle Quintanilha, Hanna Matsuda, Edgar Andrés, Guilherme Queiroga, Douglas Domingues, Jonas Gaiarsa, Cushla Metcalfe, Silvia Blanco, Eleonor e Tatiana Correa) pelas experiências compartilhadas e pela convivência no período de 2009-2012. Em especial ao Bruno Karolski, pela amizade e pelas brincadeiras, que tornaram ambiente mais leve a caminhada.

Ao Fabrício Martins Lopes pelo auxílio na construção das figuras e análises exploratórias.

Ao atual grupo de pesquisa do pinhão-mansão do IAC (Marcel Mamede, Mariana Franco, Stella Nucci, Brenda Diaz) e aos que fizeram parte dele durante esta jornada (Miriam Moreira, Camila Purchati, Aline, Pamela e Rodrigo).

Aos Colegas do Alojamento do IAC Maurício (Cupple Nuddles), Anderson (Fogo), Tácio, Alex (Tião Carreiro), Renan (Tatuzinho), Bruno Eloi, Jéssica, Renata, Suelen, Nadiane, pelo período convivido, pelos jantares coletivos coletivos, pelas brincadeiras que tornavam os dias mais leves.

A todos os colegas do curso de Biotecnologia, companheiros de USP e aos que se fizeram amigos: Helena Villela, Aline Neves, Wesley Marques, Carol, Leonor, Sílvia, Augusto Tomba, Nathalia Fuoco, Paulo Marcelo.

À minha MÃE pelo seu imenso amor, por estar incessantemente orando a Deus por mim todos os dias em que estive longe, pois suas mãos se agigantavam para vencer os exatos 1421,55 Km que nos separavam fisicamente, e em todos os momentos me fez sentir amado e afagado e quando necessário carregado no colo. Obrigado pelo seu incentivo e a sua crença em meus propósitos que me deu força e coragem para seguir meus caminhos e vencer os desafios.

A meu PAI pelo seu total apoio, por todas as suas vindas à São Paulo e Campinas para me acompanhar, suprir minhas necessidades, trazer as minhas origens para mais perto de mim e me fazer lembrar que não estava sozinho.

À minha irmã pelas ligações, conversas, pelo apoio financeiro e pelo seu carinho e companheirismo incondicional.

Aos meus tios, Aldívio, por estar sempre zelando pela minha mãe, irmã e sobrinha.

Aos meus tios Mábia e Geró, que cuidaram de mim com muito amor e me deram suporte para dar os primeiros passos nesta cidade.

Ao Manuel, Jussara e Bruna pelo amor, companheirismo, pelos finais de semana em família proporcionados.

Às minhas tias avós de São Paulo Losa e Dina e ao Tio Fabrício (Fau) pelo amor e apoio.

Aos primos da família Lacerda, Rafael, Hugo, Bruna, Fabiana (Fafá) e Luiz, Flaviana (Kika) pelo apoio.

À todos os membros da minha família que me apoiaram.

À Silvia Blanco que se tornou um membro da minha família, por todo o período convívio, por acreditar em mim, por partilhar e me apoiar em todas as dificuldades.

Aos amiguinhos Guilherme e Bruna Blanco por ser minha família aqui e trazer sorriso quando não se tinha nada para sorrir.

Aos amigos Wilson e Antonieta, Walner e Simone, pelo acolhimento e apoio em geral.

As amigadas de São Paulo do Indianas Kitnet: Paulo Mosca, Marjory Ono, Alessandra, Jô, Dell.

Aos amigos mais que especiais: Rafael Albuquerque e Helena Villela pela amizade sincera e por poder contar com eles sempre e em todas as horas.

Aos amigos de Campinas, Marcel, Evandro, Iracema, Mariana, Daniel Darbello, Leonardo Bilia, Catharine Pereira, Raissa Garcia, Liniker Luiz, Laiza, Bruna Gioria e Thais por tornarem meus dias mais leves e fazerem parte desta nova fase de minha vida.

À Talita Stessuk, pelo apoio e companheirismo durante a convivência.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desta pesquisa.

“A maravilhosa disposição e harmonia
do universo só pode ter tido origem
segundo o plano de um Ser que tudo
sabe e tudo pode. Isso fica sendo a
minha última e mais elevada
descoberta”.

Isaac Newton

RESUMO

Gomes KA. Diversidade alélica, metabólica e físico-química da biossíntese de ácidos graxos e ésteres de forbol em diferentes genótipos de *Jatropha curcas* L. [tese (Doutorado em Biotecnologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2014.

Jatropha curcas L., também conhecida no Brasil como pinhão-mansão, é uma oleaginosa que atraiu a atenção do mundo para seu potencial bioenergético dado a qualidade e o alto conteúdo de óleo na semente. Trata-se de uma planta tropical que tolera bem a seca e exige baixa quantidade de água e nutrientes sendo capaz de crescer em solos marginais. O teor de óleo de suas sementes é cerca de 300-400 g kg⁻¹, e pode ser usado diretamente como combustível ou como um substituto ao diesel, após a transesterificação. Contudo, a espécie necessita de um programa de melhoramento genético para que características de interesse sejam fixadas em bancos de germoplasma. Este trabalho teve como objetivo identificar e analisar a diversidade alélica, metabólica e físico-química relacionada à síntese de óleo e ésteres de forbol em uma amostra de 28 acessos do Banco Ativo de Germoplasma (BAG) do IAC (Instituto Agrônomo de Campinas) para seleção de genótipos elite. Os genes MFP2 (Multifunctional Protein 2), KASIII (Ketoacyl-Acyl Carrier Protein Synthase III) e 3-N-D (3-*N*-debenzoyl- 2-deoxytaxol *N*-benzoyltransferase), envolvidos na biossíntese de óleo e de taxol, foram selecionados a partir de Gomes et al. (2010). Uma região conservada para cada um dos genes foi selecionada e os resultados obtidos permitem identificar a diversidade alélica dentro do BAG-IAC para estes genes. O estudo da expressão desses mesmos genes foi bastante variável entre os genótipos ao longo do desenvolvimento do fruto. A abordagem metabólica aponta acúmulo variável de ácidos graxos ao longo do desenvolvimento da semente de *J. curcas* entre os genótipos do BAG-IAC indicando uma provável regulação diferenciada da via metabólica de óleo. A partir da análise físico-química de Poder Calorífico Superior verifica-se que há um espectro de variação destes valores entre os genótipos estudados onde foi possível observar genótipos com altos valores caloríficos confirmando resultados anteriores. Por fim, o estudo realizado permite combinar a diversidade alélica, expressão dos genes, conteúdo metabólico e poder calorífico para a seleção de genótipos e identificação de parentais para cruzamentos no quadro do programa de melhoramento do IAC.

Palavras-chave: *Jatropha curcas*. Banco de germoplasma. Diversidade alélica. Biossíntese de óleo. Melhoramento genético.

ABSTRACT

Gomes KA. Allelic, metabolics and physicochemical diversity of fatty acids and phorbol esters biosynthesis in different *Jatropha curcas* L. genotypes [Thesis (Doctoral Thesis in Biotechnology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2014.

Jatropha curcas L., also known as physic nut, is an oilseed crop that attracted the world's attention for its energy potential due to the high quality and content of oil in its seeds. It is a tropical plant that tolerates drought and requires low water amount and nutrients being able to grow on waste lands. The oil seeds content is near to 300-400 g kg⁻¹, which can be used directly as a fuel or as a diesel substitute, after transesterification. Nevertheless, this species still needs of breeding programs so that interest traits may be fixed in germplasm banks. This study aimed to identify and analyze allelic, metabolic and physicochemical diversity related to oil and phorbol synthesis as well as gene expression in these pathways based on a sample of 28 accessions from the Active Germplasm Bank (BAG) at the Agronomic Institute of Campinas (IAC) in the perspective of elite genotypes selective breeding. MFP2 (Multifunctional Protein 2), KASIII (Ketoacyl-Acyl Carrier Protein Synthase III) and 3-ND (3-N-2-deoxytaxol debenzoyl- N-benzoyltransferase) genes involved in oil and taxol biosynthesis were selected from Gomes et al. (2010). A conserved region for each gene was selected and the results obtained here allow identify the allelic diversity within IAC-BAG for these genes. Furthermore, the gene expression study showed highly variable levels between genotypes throughout fruit development. Regarding to metabolic approach, it was seen a variable fatty acids accumulation throughout seed development among *J. curcas* genotypes from BAG-IAC indicating a putative differential regulation in oil metabolic pathway. From the standpoint of physico-chemical analysis of Calorific Values there is a variation spectrum in these values between genotypes, where it was observed genotypes with high calorific values confirming previous results. This study allows combining allelic diversity, gene expression, metabolic content and calorific value for selection and parental genotypes identification for crosses within IAC breeding program.

Keywords: *Jatropha curcas*. Germplasm bank. Allelic diversity. Oil biosynthesis. Selective breeding.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- <i>Jatropha curcas</i> : (a) Estrutura de um arbusto de <i>Jatropha</i> em campo, (b) Inflorescência in situ, (c) Inflorescência vista em aumento de 10X, (d) Folha, (e) Frutos semi-abertos abrigando a semente, (f) Flor masculina com grãos de pólen conspicuos, (g) Frutos em diferentes estádios de maturação, (h) Semente coberta pericarpo (i) Semente com e sem o invólucro evidenciando a película branca que reveste o embrião.....	32
Figura 2- Fenologia de <i>J. curcas</i> no Brasil.	34
Figura 3- Síntese e metabolismo de lipídios ocorrem em várias organelas e em alguns casos envolve o movimento de lipídios de um compartimento celular a outro.....	37
Figura 4- Vias do metabolismo secundário e exemplos das principais classes.....	40
Figura 5- Estrutura molecular das principais classes de terpenos.....	40
Figura 6- As vias de biossíntese de terpenos. Fonte: Adaptado de Taiz e Zeiger (2010) e de Dewick (2009).....	42
Figura 7- Representação da estrutura do gene MFP2 de <i>Arabidopsis thaliana</i> com seus 18 éxons e 17 íntrons.....	49
Figura 8- Representação dos domínios funcionais da proteína MFP2 de <i>Arabidopsis thaliana</i>	49
Figura 9- Atividade da MFP2 na via metabólica da “Biossíntese de ácidos graxos insaturados”, KEGG map 01040.....	50
Figura 10- Atividade da MFP2 na via metabólica de “Elongação de ácidos graxos” que ocorre na mitocôndria e retículo, KEGG map 00062 adaptado.....	51
Figura 11- Atividade da enzima Fab H codificada pelo gene Ketoacil-ACP Sintase III na via metabólica de “Biossíntese de ácidos graxos” que ocorre nos plastídeos, KEGG map 00061.....	52
Figura 12- Atividade da enzima (2.3.1.167) 3-N-debenzoil- 2-deoxitaxol N-benzoiltransferase codificada pelo gene 3'-N-D na via metabólica de “Biossíntese de Diterpenóides” KEGG map 00904.....	53
Figura 13- Mapa do banco de <i>J. curcas</i> do IAC com a indicação de cada indivíduo em campo e a respectiva origem geográfica.....	56

Figura 14- Cultivo em Campo na Fazenda Santa Elisa (IAC) de 2000 plantas pertencentes a 102 acessos de *J. curcas* L. oriundos de 26 regiões geográficas. (a) e (b) mostram a plantação na estação seca (foto tirada em 21.09.2011). (c) e (d) mostram a plantação na estação chuvosa (período vegetativo- imagem de 23.11.2012).....57

Figura 15- (a) 108 híbridos F1; (b) 124 retrocruzamentos; (c) 6 genótipos selvagens (1- *J. podagrica*; 2- *J. multifida*; 3- *J. integerrima*; 4- *J. pandurifolia*; 5- *J. pohliana*; 6- *J. gossypifolia*) do BAG IAC.....57

Figura 16- DNA genômico de 50 genótipos de *Jatropha* do Banco Ativo de Germoplasma do IAC (Instituto Agrônomo de Campinas) resolvidos em gel de agarose 1% em tampão TBE 0.5X. (A) Plantas de 1 a 25 (B) Plantas de 26 a 50. Destacado em rosa os 10 indivíduos selecionados para as clonagens.....64

Figura 17- PCR de verificação dos iniciadores (MFP2, 3-N-D e KAS III) e dos amplicons gerados. O DNA genômico utilizado foi o do genótipo L13P30 de *J. curcas* do Banco Ativo de Germoplasma do IAC. O gel apresentado foi feito em agarose 1% em tampão TBE 0.5X corado com gel red.....65

Figura 18- PCR de verificação do iniciador MFP2 amplificado com DNA de 50 genótipos do BAG-IAC. O gel apresentado foi feito em agarose 1% em tampão TBE 0.5X. As caixas vermelhas em A e B indicam os amplicons selecionados para clonagem e sequenciamento.....66

Figura 19- PCR de verificação do iniciador KAS III amplificado com DNA de 50 genótipos do BAG-IAC. O gel apresentado foi feito em agarose 1% em tampão TBE 0.5X. As caixas vermelhas em A e B indicam os amplicons selecionados para clonagem e sequenciamento.....67

Figura 20- PCR de verificação do iniciador 3-N-D amplificado com DNA de 50 genótipos do BAG-IAC. O gel apresentado foi feito em agarose 1% em tampão TBE 0.5X. As caixas vermelhas em A e B indicam os amplicons selecionados para clonagem e sequenciamento.....68

Figura 21- Distribuição geográfica dos 10 genótipos de *J. curcas* do BAG estudados quanto à diversidade alélica.....69

Figura 22- Predição da estrutura do gene MFP2 obtida pelas homologias do alinhamento entre as ESTs de sementes (Gomes et al., 2010) contra o genoma de *Jatropha curcas* L.....70

Figura 23- Variação intra-genótipica do gene MFP2 obtida após alinhamento múltiplo entre as sequências de um mesmo genótipo. A figura ilustra o número de alelos encontrados para cada indivíduo.....71

Figura 24- Janela de análise do alinhamento múltiplo dos contigs do gene MFP2 gerado pela ferramenta Clustal Omega Multiple Alignment. A figura mostra a região conservada de 135 pb usada na identificação dos estados alélicos do gene MFP2 (Proteína Multifuncional 2). As estrelas em preto e os retângulos coloridos representam os 8 haplótipos identificados para o locus e caixa vermelha indica a sequência genômica de referência.....72

Figura 25- Janela de análise do alinhamento múltiplo da tradução dos contigs do gene MFP2 na frame 1, gerado pela ferramenta Clustal Omega Multiple Alignment. Os retângulos coloridos e as estrelas representam as diferentes proteínas produzidas pelos haplótipos.....74

Figura 26- Árvore filogenética inferida para o gene MFP2 usando o método Neighbor-Joining (Saitou, Nei,1987). As distâncias evolutivas foram calculadas usando o método de máxima verossimilhança (Tamura, Nei, Kumar,2004) e estão em unidades do número de substituições de bases por local. As análises foram realizadas com o programa MEGA6.....76

Figura 27- Predição da estrutura do gene MFP2 obtida pelas homologias do alinhamento entre as ESTs de sementes (Gomes et al., 2010) contra a sequência genômica de *Jatropha curcas* L.....77

Figura 28- Variação intra-genotípica do gene KAS III obtida após alinhamento múltiplo entre as sequências de um mesmo genótipo. A figura ilustra o número de alelos encontrados para cada indivíduo.....78

Figura 29- Janela de análise do alinhamento múltiplo dos contigs do gene KAS III gerado pela ferramenta Clustal Omega Multiple Alignment. A figura mostra a região conservada de 120 pb usada na identificação dos estados alélicos do gene KAS III (Ketoacil-ACP-sintase III). As estrelas em preto e os retângulos coloridos representam os 8 haplótipos identificados para o locus e caixa verde indica a sequência genômica de referência.....79

Figura 30- Janela de análise do alinhamento múltiplo da tradução dos contigs do gene KAS III na frame 1(Emboss Transeq), gerado pela ferramenta Clustal Omega Multiple Alignment. Os retângulos coloridos representam as diferentes proteínas produzidas pelos haplótipos.....80

Figura 31- Árvore filogenética inferida para o gene KASIII usando o método Neighbor-Joining (Saitou, Nei,1987). As distâncias evolutivas, foram calculados usando o método máxima verossimilhança (Tamura, Nei, Kumar, 2004) e estão em unidades do número de substituições de bases por local. As análises foram realizadas com o programa MEGA6.....81

Figura 32- Predição da estrutura do gene 3'-N-D obtida pelas homologias do alinhamento entre as ESTs de sementes (Gomes et al., 2010) contra a sequência genômica de *Jatropha curcas* L.....82

Figura 33- Variação intra-genótipica do gene 3'-N-D obtida após alinhamento múltiplo entre as sequências de um mesmo genótipo. A figura ilustra o número de alelos encontrados para cada indivíduo.....82

Figura 34- Janela de análise do alinhamento múltiplo dos contigs do gene 3-N-D gerado pela ferramenta Clustal Omega Multiple Alignment. A figura mostra a região mais conservada entre os fragmentos com 93 pb e que foi usada na identificação dos estados alélicos. Os símbolos representam alguns dos haplótipos identificados para o locus.....83

Figura 35- Janela de análise do alinhamento múltiplo da tradução dos contigs do gene KAS III na frame 1(Emboss Transeq), gerado pela ferramenta Clustal Omega Multiple Alignment. Os retângulos coloridos e estrelas em preto representam algumas das diferentes proteínas produzidas pelos haplótipos.....85

Figura 36- Árvore filogenética inferida para o gene 3'-N-D usando o método Neighbor-Joining (Saitou, Nei,1987). As distâncias evolutivas, foram calculados usando o método máxima verossimilhança (Tamura, Nei, Kumar, 2004) e estão em unidades do número de substituições de bases por local. As análises foram realizadas com o programa MEGA6.....87

Figura 37- Análise comparativa das árvores filogenéticas inferida para os 3 genes (MFP2, KASII e 3'-N-D).....88

Figura 38- (a) inflorescência de *J. curcas*; (a1) botão floral. (b) Três estádios de desenvolvimento dos frutos após polinização. (b1) estágio 1- fruto com medida entre 5 e 10 mm ou ~15 dias; (b2) estágio 2- fruto com medida entre 10 e 20mm ou ~19 dias; (b3) estágio 3- fruto com medida entre 20 e 40 mm ou ~23. As medidas dos frutos foram feitas do ápice a base com paquímetro.....96

Figura 39- Produto de PCR dos primers (MFP2, 3'-N-D e KASIII) amplificados com DNA genômico da variedade L13P30 (*Jatropha curcas* L. do BAG-IAC) resolvidos em gel de agarose 1%.....101

Figura 40- RNAs totais extraídos de Folhas Jovens de genótipos contrastantes para Óleo e Forbol (*Jatropha curcas* L. do BAG-IAC) resolvidos em gel de agarose 1%.....102

Figura 41- RNAs totais extraídos de botões florais de genótipos contrastantes para Óleo e Forbol (*Jatropha curcas* L. do BAG-IAC) resolvidos em gel de agarose 1%.....102

Figura 42- RNAs totais extraídos de Sementes de Frutos Estádio 1 de genótipos contrastantes para Óleo e Forbol (*Jatropha curcas* L. do BAG-IAC) resolvidos em gel de agarose 1%.....103

Figura 43- RNAs totais extraídos de Sementes de Frutos Estádio 2 de genótipos contrastantes para Óleo e Forbol (*Jatropha curcas* L. do BAG-IAC) resolvidos em gel de agarose 1%.....103

Figura 44- RNAs totais extraídos de Sementes de Frutos Estádio 3 de genótipos contrastantes para Óleo e Forbol (*Jatropha curcas* L. do BAG-IAC) resolvidos em gel de agarose 1%.....104

Figura 45- Curvas padrão obtidas nos testes de padronização da eficiência das reações de RT-PCR em tempo real para os genes (A) MFP2, (B) KASIII, (C) 3'-N-D e (D) Ubiquitin. Os gráficos mostram a amplificação do material de acordo com a diluição das amostras (lado esquerdo), a partir da qual foi gerada a curva padrão expressa como a média dos Cts em função da diluição da amostra (direita). Os valores de R² podem ser visto em cada gráfico.....105

Figura 46- Cluster de expressão obtido após análise dos valores de expressão relativa do gene MFP2 em relação ao tecido folha pelo método 2- $\Delta\Delta$ CT. A figura mostra os valores da expressão relativa obtida por cada genótipo e em cada tecido. A escala mostra a relação entre as cores e o número de vezes que o gene é superexpresso em relação ao controle. Os valores de desvio padrão estão em anexo.....107

Figura 47- Cluster de expressão obtido após análise dos valores de expressão relativa do gene KAS III em relação ao tecido folha pelo método 2- $\Delta\Delta$ CT. A figura mostra os valores da expressão relativa obtida por cada genótipo e em cada tecido. A escala mostra a relação entre as cores e o número de vezes que o gene é superexpresso em relação ao controle.....108

Figura 48- Cluster de expressão obtido após análise dos valores de expressão relativa do gene 3'-N-D em relação ao tecido folha pelo método 2- $\Delta\Delta$ CT. A figura mostra os valores da expressão relativa obtida por cada genótipo e em cada tecido. A escala mostra a relação entre as cores e o número de vezes que o gene é superexpresso em relação ao controle.....109

Figura 49- Estádios de maturação dos Frutos de *J. curcas* coletados para extração de óleo das sementes. (a) estágio 1- fruto com medida entre 5 e 10 mm ou ~15 dias após polinização; (b) estágio 2- fruto com medida entre 10 e 20mm ou ~19 dias após polinização; (c) estágio 3- fruto com medida entre 20 e 40 mm ou ~23 dias após polinização.....118

Figura 50- Método de extração via Extrator Soxhlet. (a) Estrutura do soxhlet montada com (a1) malha, (a2) câmara de vidro com a amostra envolvida por papel de filtro e (a3) condensador. (b) Evaporador para separação do óleo e do solvente. (c) Óleo de *J. curcas* sendo evaporado. (d) óleo sendo extraído no Extrator Soxhlet. (e) Óleo após evaporação do solvente.....119

Figura 51- Ácidos graxos totalizados em 3 estádios de desenvolvimento da semente de *J. curcas* em 12 genótipos contrastantes do BAG-IAC.....121

Figura 52- Distribuição percentual dos ácidos graxos que ocorrem durante o primeiro estágio (estádio 1) de desenvolvimento da semente de *J. curcas* em 12 genótipos contrastantes do BAG-IAC.....122

- Figura 53-** Distribuição percentual dos ácidos graxos que ocorrem durante o segundo estágio (estádio 2) de desenvolvimento da semente de *J. curcas* em 12 genótipos contrastantes do BAG-IAC.....123
- Figura 54-** Distribuição percentual dos ácidos graxos que ocorrem durante o terceiro estágio (estádio 3) de desenvolvimento da semente de *J. curcas* em 12 genótipos contrastantes do BAG-IAC.....124
- Figura 55-** (A) Pontuações de PCA para variação da composição de ácidos graxos nas sementes do Estádio 1 em 12 genótipos de *J. curcas*. (B) Gráfico de variáveis considerando apenas variáveis ativas.....126
- Figura 56-** (A) Pontuações de PCA para variação da composição de ácidos graxos nas sementes do Estádio 2 em 12 genótipos de *J. curcas*. (B) Gráfico de variáveis considerando apenas variáveis ativas.....127
- Figura 57-** (A) Pontuações de PCA para variação da composição de ácidos graxos nas sementes do Estádio 3 em 12 genótipos de *J. curcas*. (B) Gráfico de variáveis considerando apenas variáveis ativas.....128
- Figura 58-** (a) Frutos de *J. curcas* no 4 e 5 estágio de desenvolvimento. (b) Semente dos frutos armazenadas em tubos falcon antes da trituração.....134
- Figura 59-** (A) O Calorímetro. (B) Recipiente calorimétrico. (C) e (F)- Amostra de óleo no recipiente interno. (D) Fios de Ferro para ignição. (E) Bomba Calorimétrica.....136
- Figura 60-** Curvas de Variação de Temperatura em função do tempo nos 12 genótipos de *J. curcas* contrastantes para conteúdo de óleo e ésteres de forbol do BAG-IAC.....138
- Figura 61-** Poder Calorífico Superior à volume constante (PCSV) nos 12 genótipos de *J. curcas* contrastantes para conteúdo de óleo e ésteres de forbol do BAG-IAC.....140
- Figura 62-** Comparação dos Poderes Caloríficos Superiores (PCSV) entre o óleo de *J. curcas* e os principais combustíveis automotivos. O PCS de *J. curcas* usado na figura foi o encontrado por (Banapurmath et al., 2012).....141

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Identificação dos 50 genótipos de <i>J. curcas</i> do Banco de Germoplasma do (IAC). Em amarelo os genótipos selecionados para clonagem e sequenciamentos dos fragmentos.....	58
Tabela 2- Características das quatro ESTs selecionadas para o estudo.....	60
Tabela 3- Características dos iniciadores desenhados para cada gene.....	61
Tabela 4- Genótipos de <i>J. curcas</i> classificados de acordo com a origem geográfica e utilização em programa de melhoramento genético.....	69
Tabela 5- Genótipos contrastantes selecionados para a análise de expressão dos genes (MFP2, 3'-N-debenzoyl, Ketoacil-ACP-sintase III). Discriminação das coletas realizadas no ano agrícola de 2012.....	95
Tabela 6- Condições climáticas no Campo (Fazenda Santa Elisa-IAC) nos dias de coleta dos tecidos.....	96
Tabela 7- Características dos iniciadores desenhados para cada gene.....	98
Tabela 8- Cálculo da eficiência de amplificação dos pares de primers utilizados nas reações de PCR em tempo real.....	106
Tabela 9- Percentual (%) da composição de ácidos graxos em sementes de <i>J. curcas</i>	117
Tabela 10- Condições edafoclimáticas na fazenda Santa Elisa –IAC (Campinas) nos dias de coleta.....	134
Tabela 11- Densidade e Poderes Caloríficos Superiores dos principais combustíveis.....	140

LISTA DE ABREVIATURAS

J. curcas- *Jatropha curcas* L.

KAS III- Ketoacil-ACP Sintase III

MFP2- Proteína Multifuncional 2

3'-N-D'- 3-N-debenzoil- 2-deoxitaxol N-benzoiltransferase

LISTA DE SIGLAS

AFLP- (Amplified Fragments Length Polymorphism)

ANP- (Agência Nacional do Petróleo)

ASTM- (American Society of Test Materials)

BAG- (Banco Ativo de Germoplasma)

IAC- (Instituto Agronômico de Campinas)

SSR- (Simple Sequence Repeat)

SNP- (Single Nucleotide Polymorphism)

ISSR- (Inter-Simple Sequence Repeat)

FAO STAT- (Food and Agriculture Organization of the United Nations)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL.....	23
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	26
2.1 Porque biodiesel?.....	26
2.2 Porque <i>Jatropha curcas</i> para bioenergia?.....	27
2.3 Origem, distribuição e diversidade de <i>J. curcas</i>	28
2.4 Domesticação	30
2.5 Botânica e fenologia.....	31
2.6 Os desafios da cultura e o melhoramento Genético.....	34
2.7 A biossíntese de ácidos graxos.....	36
2.8 Toxicidade e biossíntese de ésteres de forbol.....	39
3 OBJETIVOS.....	44
3.1 Objetivos específicos.....	44
 CAPÍTULO 1- DIVERSIDADE ALÉLICA DE GENES ENVOLVIDOS NA BIOSÍNTESE DE ÓLEO E DE TAXOL EM DIFERENTES GENÓTIPOS DO BAG IAC	
4.1 Introdução e revisão de literatura.....	46
4.1.1 O Polimorfismo de SNPs.....	47
4.1.2 O gene da proteína multifuncional.....	48
4.1.3 O gene <i>Ketoacil ACP sintase III</i>	51
4.1.4 O Gene <i>3-N-Debenzoil</i>	52
4.2 Material e métodos.....	54
4.2.1 O BAG do IAC.....	54
4.2.2 A seleção do material vegetal.....	58
4.2.3 Extração de DNA.....	59
4.2.4 Os domínios funcionais das ESTs em estudo.....	60
4.2.5 O desenho dos iniciadores.....	60
4.2.6 Amplificação dos loci via PCR.....	61
4.2.7 Clonagem dos fragmentos genômicos.....	61
4.2.8 Sequenciamento e montagem.....	62
4.2.9 Análise de polimorfismos de SNPs e estudo de diversidade alélica.....	63
4.2.9.1 Determinação do estados alélicos.....	63
4.3 Resultados.....	64
4.3.1 Extração de DNA genômico.....	64
4.3.2 Amplificação dos loci.....	65
4.3.3 Identificação dos haplótipos.....	68
4.3.3.1 O gene <i>MFP2</i>	69
4.3.3.2 O gene <i>KASIII</i>	77
4.3.3.3 O gene <i>3-N-D</i>	81
4.4 Discussão.....	89
4.4.1 Variação da frequência alélica.....	89
4.4.2 Variação em termos de polimorfismo de sequencia.....	90

CAPÍTULO 2- DIVERSIDADE DA EXPRESSÃO DOS GENES MFP2, KAS III E 3'-N-D TAXOL EM GENÓTIPOS CONTRASTANTES DE *JATROPHA CURCAS* L.

5.1 Introdução e revisão de literatura.....	93
5.1.1 Estudos de expressão em genes de interesse em <i>J. curcas</i>	93
5.2 Material e métodos.....	95
5.2.1 A seleção dos genótipos do BAG e procedimento de coleta.....	95
5.2.2 Extração de RNA total e síntese de cDNA.....	97
5.2.3 Desenho dos iniciadores.....	97
5.2.4 Amplificação dos loci via PCR convencional.....	98
5.2.5 Eficiência da reação de amplificação.....	98
5.2.6 Reações de PCR em tempo real.....	99
5.2.7 Análise de dados.....	100
5.3 Resultados.....	101
5.3.1 Teste de primers por PCR convencional.....	101
5.3.2 Extração de RNA total.....	101
5.3.3 Teste de eficiência dos primers por PCR em tempo real.....	104
5.3.4 Análise da expressão gênica relativa pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$	106
5.3.4.1 A expressão do gene MFP2.....	106
5.3.4.2 A expressão do gene KASIII.....	107
5.3.4.3 A expressão do gene 3'-N-D.....	109
5.4 Discussão.....	111
5.4.1 A expressão do gene MFP2.....	111
5.4.2 A expressão de KASIII.....	112
5.4.3 A expressão de 3-N-D.....	113

CAPÍTULO 3- DIVERSIDADE METABÓLICA DE ÁCIDOS GRAXOS AO LONGO DO DESENVOLVIMENTO DO FRUTO DE *JATROPHA CURCAS* L.

6.1 Introdução e revisão de literatura.....	116
6.1.1 O óleo de <i>J. curcas</i>	116
6.2 Material e métodos.....	118
6.2.1 Seleção de genótipos, coleta e quenching do material vegetal.....	118
6.2.2 Extração de óleo via método de soxhlet.....	119
6.2.3 Análise da composição de ácidos graxos por GC-FID.....	120
6.2.4 Análise de dados.....	120
6.3 Resultados.....	121
6.3.1 Ácidos graxos totalizados.....	121
6.3.2 Mudanças na composição de ácidos graxos ao longo do desenvolvimento da semente de <i>J. curcas</i>	122
6.3.3 Análise multivariada.....	125
6.4 Discussão.....	129

CAPÍTULO 4- DIVERSIDADE FÍSICO-QUÍMICA PELA DETERMINAÇÃO DO PODER CALORÍFICO DO ÓLEO EM GENÓTIPOS CONTRASTANTES DE *JATROPHA CURCAS* L.

7.1 Introdução.....	132
7.2 Material e métodos.....	134
7.2.1 Seleção de genótipos e armazenamento.....	134
7.2.2 Extração de óleo.....	134
7.2.3 Ensaios de determinação de poder calorífico superior.....	135
7.2.4 Tratamento dos dados.....	137
7.3 Resultados.....	138
7.3.1 Curvas de variação de temperatura em função do tempo.....	138
7.3.2 Comparação do poder calorífico do óleo de <i>J. curcas</i> com outras fontes de combustível.....	140
7.4 Discussão.....	142
8 CONCLUSÕES GERAIS.....	143
REFERÊNCIAS.....	144

1 INTRODUÇÃO GERAL

Discorrer sobre a necessidade de implementação de fontes de energia renováveis como alternativa aos combustíveis fósseis é justificável face ao cenário energético do mundo atual. As mudanças climáticas globais, o previsível esgotamento do petróleo, assim como o aumento dos preços dos seus derivados torna imprescindível a busca por fontes alternativas de energia tais como os biocombustíveis.

Este tipo de energia hoje é baseado principalmente em grandes culturas alimentares para seu abastecimento em todo o mundo a exemplo da cana-de-açúcar (bioetanol) e soja (biodiesel). Isso implica que esta produção continuará sendo marginal caso não haja diversificação destas fontes (Carels, 2011). Além disso, a comunidade internacional tem buscado por uma segunda e terceira geração de biocombustíveis.

Avaliando-se particularmente o caso do biodiesel, é ainda mais urgente a necessidade de diversificação de oleaginosas potenciais para sustentar a crescente demanda e atender ao B5 (5% de biodiesel), mistura obrigatória no Brasil desde 2010 conforme determinação do Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel (PNPB), regulamentado pela lei n. 11.097/2005. Atualmente no país, esta demanda é alimentada basicamente pela soja (80%), o que caracteriza uma situação de risco para o fornecimento sustentável à longo prazo.

Dentre as oleaginosas disponíveis para este fim, está a *Jatropha curcas* L. (Plantae; Embriófitas; Spermatopsida; Malpighiales; Euphorbiaceae; Jatropha) que oferece as características de interesse, muito embora seja uma espécie ainda não domesticada que requer melhoramento genético para se tornar uma cultura industrial. Essa espécie é conhecida no Brasil como pinhão-mansão e é uma das fontes promissoras e viáveis para diversificar a produção de biodiesel, sobretudo nos climas tropicais brasileiros, porque em geral possui uma elevada produtividade, um óleo de qualidade e também é apta a crescer em solos marginais, inapropriados ao cultivo de alimentos (Carels, 2009).

Jatropha curcas L. é um arbusto caducifólio de tronco suculento, que pode atingir até ~ 5 m de altura e produz sementes ricas em óleo (27-40%). O óleo bruto de *J. curcas* atende aos padrões de qualidade dos combustíveis de colza e pode ser convertido em biodiesel por transesterificação atendendo às normas americanas e

européias, além das brasileiras conforme determinação da Agência Nacional de Petróleo (ANP). No entanto, conforme mencionado anteriormente, o fato de ainda não ser uma espécie totalmente domesticada, o seu cultivo em grande escala apresenta dificuldades, pois aspectos de sua fisiologia e agronomia ainda não podem ser controlados dificultando consequentemente a previsão da produção de sementes (Ginwal et al., 2004).

Por outro lado, no intervalo de apenas sete anos de 2007-2014, grandes esforços têm sido feitos pela comunidade científica mundial, particularmente na Índia, pioneiros nos estudos acerca da diversidade genética e hibridação interespecífica desta espécie, bem como de análises usando as técnicas biotecnológicas disponíveis, incluindo a propagação *in vitro* (cultura de tecidos) e abordagens como a genômica, transcriptômica, proteômica e metabolômica no sentido de melhorar a espécie e torná-la uma grande cultura.

Apesar dos recentes avanços, a espécie permanece semi selvagem e não há, até o momento, disponibilidade de material genético estável e de qualidade que possa viabilizar a cultura como alternativa aos produtores rurais. Por isso, as instituições de pesquisas agropecuárias internacionais e nacionais, dentre estas o IAC, continuam depositando esforços para o desenvolvimento de cultivares que combinem: alta produtividade; porte mais compacto; uniformidade de maturação de flores e frutos; resistência a estresses abióticos e bióticos e especialmente um alto teor e qualidade do óleo, com alta relação: ácido oleico/linoleico (visando o aumento da estabilidade oxidativa do biodiesel) e baixo teor de substâncias tóxicas no óleo e no resíduo de extração (o que pode agregar valor do produto).

No entanto, o sucesso dos programas de melhoramento genético em andamento depende do estabelecimento de bancos ativos de germoplasma (BAG) que apresentem considerável variabilidade genética. Tão importante quanto o estabelecimento é a constante avaliação, caracterização morfológica, bioquímica e molecular do germoplasma disponível além de sua constante expansão por meio da adição de novos acessos (oriundos de diferentes partes do mundo e em particular do centro de origem e diversidade da espécie) e também da geração de novos genótipos (por meio de cruzamentos dirigidos e seleções).

Por se tratar de espécie perene, programas de melhoramento genético convencionais, envolvendo vários ciclos de seleções e recombinações, podem durar anos. Seguindo uma tendência mundial, o avanço destes programas tem sido

possível, graças à aplicação de estratégias biotecnológicas visando acelerar lançamento de cultivares estáveis e com características de interesse a fim de atender a crescente demanda dos produtores e usinas produtoras de biodiesel.

Na era pós-genômica, esforços crescentes têm sido feitos para estabelecer a relação entre o genoma e o fenótipo dos organismos. Porém, tornou-se claro que mesmo a completa compreensão do estado dos genes, de suas mensagens e das proteínas num sistema vivo, não são o bastante para revelar o seu fenótipo.

Com base nesse contexto, o presente trabalho tem como objetivo principal empregar diferentes estratégias biotecnológicas (genômica estrutural e funcional, metabolômica e físico-química) e integrá-las de modo que contribuam para o conhecimento da diversidade do banco ativo de germoplasma instalado no IAC que almeja lançar a primeira cultivar da espécie nos próximos anos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Porque Biodiesel?

De fato, enquanto houver reservas de petróleo disponíveis, dificilmente outra fonte de combustível poderá substituí-lo com a mesma eficácia energética. A estimativa de duração do petróleo depende por sua vez da descoberta de novas reservas, do aumento da produtividade nos poços e do consumo no mundo. Mesmo assim, combustíveis alternativos, renováveis e menos poluentes começaram a ser buscados e estudados em meio a uma população que cresce anualmente.

De acordo com Carels (2012), fatores como a superpopulação, a redução de recursos e a perda de biodiversidade tem sido considerados ameaçadores para a humanidade e estas forças motrizes levaram os governos em nível mundial à implementação de energias renováveis.

Vertes et al. (2006) apontam que sem os biocombustíveis as metas do Protocolo de Quioto não poderiam ser alcançadas na economia de energia global até 2050. Entre as razões por que os biocombustíveis são apropriados para essa transição estão: (i) a sua simplicidade; (ii) a sua produção através de tecnologias agrícolas bem conhecidas; (iii) o seu potencial para a mitigação do aquecimento global sem uma reestruturação completa do atual sistema energético de trabalho; (iv) o uso de motores existentes (do ciclo diesel) para o seu transporte (Kleiner 2007; Rothengatter, 2010); (v) o seu potencial para facilitar a mobilização mundial em torno de um conjunto comum de regras; (vi) o seu potencial como fonte de energia diretamente disponível com boa aceitação do público; (vii) uma distribuição mais uniforme do que as distribuições de recursos de combustíveis fósseis e nucleares; e por último (viii) o seu potencial para criar benefícios para as zonas rurais, incluindo a criação de empregos.

As matéria-primas líderes na produção de bioenergia por hectare são biodiesel a partir de óleo de palma e bioetanol a partir da cana de açúcar. Elas são cultivadas em quantidades crescentes porém, o aumento contínuo da sua produção não é sustentável e não resolverá o enorme aumento da demanda por energia.

O rendimento do óleo de palma é de aproximadamente 5.000 L/ha. No Brasil, os melhores rendimentos de bioetanol a partir da cana são 7.500 L/ha. A maior parte

da energia necessária para o cultivo da cana e convertê-la em etanol é obtida da queima de seus resíduos, ou seja, o bagaço.

Para cada unidade de energia fóssil que é consumida através da produção de etanol de cana, são recuperados ~8 unidades de energia (Bourne, 2007). Secas freqüentes em muitos países asiáticos tornaram difícil para eles reproduzirem o sucesso do Brasil com a cana, que requer uma fonte de água abundante. Tailândia e Indonésia estão aproveitando o potencial de óleo de palma.

O sentimento geral é de que os biocombustíveis de primeira geração já estão atingindo a saturação por causa da disponibilidade limitada de terras agricultáveis, o que ainda não é um problema para o Brasil que possui terras adicionais disponíveis para o cultivo da cana e de oleaginosas promissoras como *J. curcas* L. por exemplo.

O desenvolvimento desses combustíveis já tem sido um sucesso, porque eles demonstraram que motor que funciona com etanol ou biodiesel é viável sem modificação significativa da tecnologia e pode, pelo menos, ser usado para o transporte público de energia. Por fim são menos poluentes do que os derivados de petróleo que além dos NOx lançam na atmosfera compostos a base de enxofre.

2.2 Por que *J. curcas* para bioenergia?

Primeiramente, a maioria dos biocombustíveis tradicionais (tais como o etanol de milho, trigo, ou do açúcar da beterraba e também o biodiesel de oleaginosas) é produzida a partir de culturas alimentares tradicionais que exigem terras agrícolas de alta qualidade para o crescimento. E isso já é um fator que limita a produção dessas culturas para esta finalidade.

Segundo (Demirbas, 2008), a economia de biocombustíveis crescerá rapidamente durante o século 21. Atualmente, cerca de 84% da produção de biodiesel do mundo se dá pelo óleo de colza. As porções restantes são a partir de óleo de girassol (13 %), óleo de palma (1 %), óleo de soja e outros (2 %) (Gui et al. 2008). Isso significa que mais de 95 % do biodiesel produzido no mundo advém de óleos alimentares. No Brasil, 85% do B5 (5% de biodiesel no diesel fóssil) é alimentado pelo óleo de soja.

Enfim, para contornar essa situação, o biodiesel tem sido produzido cada vez mais a partir de óleos não-comestíveis e de óleo de cozinha usado (OMA). Os óleos não comestíveis oferecem a vantagem de que, teoricamente, não competem com a

produção de alimentos que é um grande gargalo do mundo de hoje visto que a previsão da FAOSTAT é de que já em 2040 comece a faltar alimento para humanidade.

Devido ao aumento do uso da terra para a produção de biocombustíveis, culturas para este fim estão agora competindo com culturas alimentares (Odling-Smee, 2007) e eles deverão ter efeitos substanciais sobre a economia. Além disso, o uso de culturas alimentares para a produção de biocombustíveis além de promover o desmatamento, cria uma dívida de carbono, liberando 17-420 vezes mais CO₂ do que o gás de efeito estufa anual (GEE) reduções que esses biocombustíveis daria pelo deslocamento de combustíveis fósseis. Em contraste, biocombustíveis a partir de resíduos de biomassa ou de biomassa cultivada em terras marginais plantadas com espécies perenes resultam na pouca ou nenhuma dívida de carbono (Fargione et al., 2008; Searchinger et al., 2008).

Considerando biocombustíveis a partir de óleos vegetais, *J. curcas* oferece várias vantagens em relação a outras oleaginosas. Primeiro, *J. curcas* pode crescer em solos marginais, e isso pode beneficiar populações mais pobres. Assim, espera-se ter um efeito social positivo, atrair investimentos do governo, estabilizar a população em áreas rurais, e fornecer à população renda e energia (Carels, 2009). Terceiro, o seu óleo pode ser queimado como óleo puro ou como biodiesel em ignição por compressão convencional de motores (IC) (Carels, 2009). Quarto, o seu impacto ambiental é menor do que o óleo da palma por exemplo já que nenhum ecossistema natural é removido para a sua implantação (Darussalam 2007; Laurence 2007; Malhi et al., 2008; Pedra 2007; Venter et al. 2008), ao contrário, *J. curcas* é usada para recuperação de terrenos marginais (Francis et al., 2005; Pandey et al., 2012). E quinto, o seu ciclo de vida justifica a sua exploração, mesmo sendo uma espécie que ainda precisa ser domesticada (Pandey et al., 2011).

2.3 Origem, distribuição e diversidade da espécie

A origem de *J. curcas* foi debatida durante muito tempo, apesar disso, já existe um consenso de que ela é originária do México e America Central (Achten et al., 2010). No século XVI os portugueses adquiriram conhecimento acerca das suas propriedades medicinais e depois estabeleceram plantações para produção de sabão e óleo de lamparina, com isso ela foi introduzida em suas colônias das ilhas

de Cabo Verde e Guiné Bissau, de onde se distribuiu a outros países da Ásia e África (Heller, 1996).

Atualmente é encontrada em vários países tropicais e subtropicais do mundo, em regiões de clima quente da América, Sudeste Asiático, Índia e África. Na América é distribuído desde México até o norte da Argentina e das Antilhas (Jongschaap et al., 2007). Também é encontrada nas regiões temperadas em menores proporções (Openshaw, 2000).

Acredita-se que sua distribuição ocorra naturalmente sobre precipitação anual variando entre 944 e 3121 mm. A espécie é bem adaptada a condições áridas e semi-áridas em parte devido a sua natureza suculenta. A maioria das espécies de *Jatropha* spp. ocorrem em áreas sazonalmente secas (Shweta et al., 2008), como savanas campestres e cerrado, porém são completamente ausentes na região úmida da Amazônia. De acordo com Sunil et al. (2012) a distribuição atual da espécie *J. curcas* mostra que sua introdução foi bem sucedida nas regiões secas dos trópicos.

Vários estudos têm sido realizados para avaliar a variabilidade genética do germoplasma de *J. curcas* utilizando marcadores morfológicos (características quantitativas) e marcadores moleculares. Em nível morfológico se tem utilizado características como altura da planta, diâmetro da corola, número de ramos primários, número de ramos secundários, área foliar média, tamanho do pecíolo, forma do botão floral, entre outras (Gohil, Pandya, 2008; Sunil et al., 2008). Outros trabalhos incluem caracteres relacionados à produção, como análises do rendimento de sementes, incluindo tamanho, peso e teor de óleo (Kaushik et al., 2007; Mishra, 2009).

Pamidimarri et al. (2010), por meio de marcadores RAPD e AFLP em acessos *J. curcas* de diferentes regiões da Índia, demonstraram a existência de baixa diversidade genética. Estes resultados corroboram com os relatados por Basha e Sujata (2007) que encontraram baixo polimorfismo, 42% e 37,4%, mediante RAPD e ISSR, respectivamente.

Ganeshram et al. (2008) e Tatikonda et al. (2009) também encontraram resultados semelhantes, indicando a necessidade de ampliar a base genética através da introdução de material com amplo contexto geográfico e a criação de variabilidade através de mutação e hibridação.

Muito embora a diversidade genética de *J. curcas* na América Central Nativa ainda não tenham sido bem estabelecida, é sugerido que o germoplasma para os programas de melhoramento genético deveriam ser introduzidos a partir de sua área nativa ao invés de se introduzirem outras populações (Sun et al., 2008).

No México, centro de origem da espécie, existe poucos estudos sobre a diversidade genética. Pecina-quintero et al. (2011) avaliaram a diversidade genética de 88 acessos coletados no sul do México com AFLPs e encontraram alto nível de polimorfismo (90%) e uma diversidade genética média de 60% entre os acessos.

No Brasil Diaz-Hernandez (2014) encontrou alta variabilidade genética entre os genótipos com o uso de marcadores ISSR em 70 genótipos do BAG-IAC, indicando alta diversidade genética de *Jatropha* contida no Banco Ativo de Germoplasma do IAC, todavia quando utilizado marcadores SSRs o nível de polimorfismo encontrado não foi tão alto.

2.4 Domesticação

Até recentemente, *J. curcas* foi a principal cultura usada como cerca viva e também para produção de sabão a partir de seu óleo. Desde então passou a se ter o conhecimento de que ela é uma cultura rentável para produção de biodiesel, e os agricultores passaram a vê-la com intuito de gerar renda, o que só seria viável com um material vegetal de qualidade (Sunil et al., 2012).

A maioria das espécies de árvores tropicais não foi domesticada intensivamente, a exceção de algumas frutíferas como cacau e manga, o café, e lenhosas como eucalipto. A domesticação de espécies arbóreas como *J. curcas* requer uma intensa intervenção humana para trazer espécies a um cultivo mais amplo por meio de um processo agrícola centrado e voltado para o mercado (Sunil, et al., 2012).

De modo geral, uma base genética ampla poderá reduzir o risco potencial de problemas de perdas por endogamia, como aborto do embrião, quantidade limitada de frutos, redução do número de sementes e baixa taxa de germinação ao longo do processo de domesticação (Sunil et al., 2012). Portanto, o manuseio de fontes genéticas intraespecífica tem um importante papel na domesticação e também na determinação da estabilidade ecológica de sistemas agrícolas (Achten et al., 2010).

Também vale apontar que é importante entender os padrões de melhoramento (panmítico/não-panmítico), para elaboração de estratégias de domesticação.

Mesmo não sendo domesticada é interessante dizer que *J. curcas* é adequada para uma rápida e eficiente domesticação comparada com outras culturas, devido a sua fácil propagação, estabelecimento e adaptação a variadas condições agro-climáticas. O que tem sido sugerido para esta espécie é a coleta de fontes genéticas de diversas partes do mundo e compará-las com o pool gênico da América Central usando marcadores moleculares, juntamente com a análise do sistema reprodutivo pelo uso de marcadores moleculares, o estudo do comportamento reprodutivo para saber a extensão da endogamia e exogamia, o melhoramento de caracteres úteis para colheita mecânica, a resistência à pragas e tolerância à seca de variedades tóxicas e atóxicas além claro, da alta produção de óleo (Achten et al., 2010).

Consequentemente, a disponibilidade de acessos de *J. curcas* bem adaptados e de bom desempenho com uma base genética ampla seria a estratégia de domesticação mais lógica para sistemas agrícolas de pequena escala uma vez que aumenta a sustentabilidade da produção (Lengkeek, 2007).

2.5 Botânica e fenologia

J. curcas é uma espécie diploide com $2n = 22$ cromossomos. Trata-se de um arbusto grande ou árvore que cresce até 3 a 4 metros em altura (Figura 1a). É uma planta alógama, monoica com flores unissexuais masculinas e femininas na mesma inflorescência do tipo cimeira definida (Domergue, Pirot, 2008) e raramente apresentam flores hermafroditas (Heller, 1996).

Suas folhas são verdes e apresentam de três a cinco lóbulos, são codiformes, estipuladas e descíduas (Figura 1d). Sua inflorescência é complexa, monodescídua com protandria (Figura 1 b-c). A primeira ramificação é racemosa e as subsequentes são cimeiras. Cimeiras são acima de 12 cm de comprimento, as flores são branco esverdeadas e unissexuais (Ratha Krishnan, Paramathma, 2009).

Figura 1- *Jatropha curcas*: (a) Estrutura de um arbusto de *Jatropha* em campo, (b) Inflorescência *in situ*, (c) Inflorescência vista em aumento de 10X, (d) Folha, (e) Frutos semi-abertos abrigoando a semente, (f) Flor masculina com grãos de pólen conspícuos, (g) Frutos em diferentes estádios de maturação, (h) Semente coberta pericarpo (i) Semente com e sem o involúcro evidenciando a película branca que reveste o embrião.

No meio da inflorescência há uma única flor feminina com o gineceu contendo 3 carpelos, estilete de três ramificações bífidas, divididas em duas partes, três lóculos, ou sacos polínicos (Figura 1c-f). As flores masculinas são em número maior e estão localizadas na ponta da ramificação. As flores femininas, menos numerosas que as masculinas, encontram-se nas ramificações (Sunil et al., 2012).

As flores masculinas constituem de um cálice com 5 pétalas; a corola campulada, em forma de cone ou campânula, com 5 lobos ou pétalas, com o pedúnculo articulado. As flores femininas apresentam-se com pedúnculo longo, não articulado, diferindo das masculinas, o perianto, todavia, é semelhante ao da flor

masculina (Divakara et al., 2010). Normalmente a taxa de flores masculinas:femininas varia de 16-27 (flores masculinas): 1 (flor feminina) até 108 (flores masculinas): 1 (flor feminina).

Dehgan e Webster (1979) foram os primeiros a notar variação nos caracteres dos frutos em várias espécies do gênero *Jatropha*. A morfologia dos caracteres dos frutos varia não apenas na forma, mas também no tamanho. O fruto de *J. curcas* é caracterizado por ser uma capsula trilocular essa capsula pode explodir ou ser tardiamente deiscente com um único loco por semente (Figura 1 e-g). O pericarpo é áspero e com fissuras, reticulados com depósitos cuticulares (Bahadur, Goverdhan, 1996).

As sementes são grandes de 1,6-2,5 cm de comprimento por 1,2 x 1,5 de espessura, de forma triangular a elipsóide. Ponta áspera, coloração marrom escuro ao preto lenhoso, estriada, um pouco áspera e quebradiça quando madura (Figura 1h-i).

Segundo Marques et al. (2013), embora *J. curcas* seja auto-compatível permitindo auto-polinização e desenvolvimento de frutos por geitonogamia, a produção de frutos ocorre predominantemente por xenogamia devido à não sincronização da abertura das flores femininas e masculinas de uma mesma inflorescência. Alguns estudos relatam que a espécie apresenta protoandria, com flores masculinas abrindo antes das femininas (Raju, Ezradanam, 2002).

No Brasil, o contrário tem sido observado com flores femininas abrindo antes das masculinas (protoginia) (Saturnino et al., 2005; Marques et al, 2013). Em ambos os casos a fertilização cruzada é favorecida. Brattacharya et al. (2005) e Pranesh et al. (2010) revelaram uma taxa de 32,0% e 28,5% de apomixia, respectivamente. Segundo Juhász et al. (2009) Esta taxa foi bem menor - 5,0% ou nula em condições experimentais no Brasil. A polinização é entomológica e os polinizadores principais são abelhas, moscas, trips e formigas (Dehgan, Webster, 1979; Ghosh, Singh, 2008; Saturnino, 2005).

De acordo com Marques et al. (2013), no sudeste brasileiro, a fenologia é praticamente anual com o florescimento se iniciando em meados de outubro e se estendendo por longo período que depende da disponibilidade de água e nutrientes (Figura 2).

Figura 2- Fenologia de *J. curcas* no Brasil.

Fonte: Marques et al. (2013).

2.7 Os desafios da cultura e o melhoramento genético

Devido aos aspectos fenológicos, *J. curcas* requer pelo menos 15 anos para ser melhorada antes de atingir um nível de domesticação comparável com outras culturas industriais (Achten et al., 2010). As características fenotípicas imediatamente mais importantes para a seleção de candidatos em *J. curcas* são a produção de sementes, tamanho da semente e rendimento de óleo (Mishra, 2009). No caso de colheita mecânica, a maturação uniforme de frutos, e o nanismo também se tornam importantes (Gressel, 2008).

Características adicionais que devem ser consideradas para o cultivo seletivo são: armazenamento de energia, síntese de ácidos graxos, resistência a doenças, a síntese de compostos tóxicos, sincronismo de florescimento, dioicia, tamanho do fruto e estrutura da árvore. Caracteres tais como a quantidade de ácidos graxos livres ou *Free Fatty Acids* (FFA), número de ácidos insaponificáveis e resíduos de carbono apresentam uma grande variação, o que também indica que a qualidade do óleo é dependente da interação de fatores genéticos e ambientais (Kaushik et al., 2006, 2007).

Um ferramenta auxiliar ao melhoramento que pode ser utilizado hoje para populações naturais, é o mapeamento por associação, que não faz sentido no caso de *J. curcas*, onde há uma baixa taxa de desequilíbrio de ligação, o que é de se esperar dada a sua baixa a moderada variabilidade genética, exceto no centro de origem (México), onde a a variabilidade genética é mais alta. Outra esta estratégia poderia ser contuta no Mexico onde a variabilidade natural é notável. Outra

alternativa viável seria a Seleção Assistida por Marcadores (SAM) somado a um grande número de descendências para se atingir níveis de recombinação e consistência estatística adequados.

Por outro lado, esta estratégia de melhoramento seletivo é purificadora e leva à redução da variabilidade genética através da captura de ambos efeitos aditivos e não-aditivos de clones elite através da seleção e propagação clonal. De fato, quanto maior é a variabilidade no interior da base genética, melhor é o resultado do processo seletivo (Carels, 2013).

Hoje, o processo de domesticação ocorre através da seleção de indivíduos promissores, coleções de germoplasma com variabilidade genética representativa da espécie e hibridizações intra e interespecíficas. A melhor prática disponível para a seleção de material de reprodução é a utilização de plantas com melhor desempenho no local de interesse. Árvores com um rendimento anual superior a 2 kg de sementes secas e de conteúdo de óleo na semente maior que 35% pode ser considerado como sendo bons acessos (Carels, 2013).

O perfil de produtos amplificados por (PCR) para analisar a diversidade entre uma coleção de acessos é atualmente uma prática comum. Indivíduos de *J. curcas* exibem um grau elevado de interação fenotípica com o ambiente, o que torna sondas de DNA genômico com polimorfismos reprodutíveis essenciais. Sondas para seqüências polimórficas são necessárias para a rápida identificação de habilidades específicas na população. Isto normalmente é avaliado correlacionando populações com traços fenotípicos específicos (Sunil et al., 2008).

Devido ao estado atual das investigações científicas sobre *J. curcas*, sobretudo pela avaliação da sua base genética e fisiologia, será promissor a ampliação do conjunto alélico por meio de hibridações inter-específicas. A introgressão de caracteres negativos em populações elites, de fato, pode prejudicar todos os investimentos a longo prazo no progresso genético acumulado nessas populações.

É válido também lembrar que a hibridação interespecífica promove a mistura e a instabilidade no genoma do híbrido, o que deve ser avaliado antes da reprodução seletiva.

As primeiras tentativas de hibridização interespecífica foram realizadas por Reddy et al. (1987) usando *Ricinus communis* L. e seis espécies do gênero *Jatropha*, i.e. *J. curcas*, *Jatropha glandulifera* Roxb., *Jatropha multifida* L., *Jatropha hastata* Jacq., *Jatropha podagrica* Hook. e *Jatropha gossypifolia* L. A

interincompatibilidade foi observada em todas as combinações interespecíficas com diferenças na germinação do pólen mostrando que *J. curcas* é mais próxima de *J. glandulifera* e *J. gossypifolia*.

Mais tarde, experimentos de hibridação interespecífica entre *J. curcas*, *J. integerrima*, *J. multifida*, *Jatropha maheshwarii* Subram. & Nayar. (Popluechai et al., 2009) ou *J. gossypifolia* L. (Karanam et al., 2010) foram bem sucedidos em suas progênes. Diferentemente de *J. tanjorensis*, um híbrido natural entre *J. curcas* x *J. gossypifolia* encontrada na Índia que é estéril (Prabakaran, Sujatha, 1999), *Nandan-4*, um híbrido artificial (F1) entre estas duas espécies (*J. curcas* (♂) x *J. gossypifolia* (♀)) é fértil. Tal híbrido artificial possui flores hermafroditas, o que pode ser uma indicação de alterações nos níveis de citocininas endógenas (Pan, Xu, 2010). Similarmente a espécie parental *J. gossypifolia*, o híbrido obtido é mais tolerante a doenças e à seca do que o pai *J. curcas*.

Outros experimentos de hibridização interespecífica envolvendo *J. curcas* como parental feminino e *J. integerrima*, *Jatropha podagrica* Hook., *Jatropha villosa* Wight., *Jatropha tanjorensis* Ellis & Saroja, *J. gossypifolia*, *J. glandulifera* Roxb., *J. multifida*, or *J. maheshwarii* Krishnan e Paramathma (2009) como doadoras de pólen (pais) foram conduzidos por Parthiban et al. (2009). Um cruzamento entre *J. curcas* e *J. integerrima* resultou em uma produção bem sucedida de sementes e permitiu o retrocruzamento com *J. curcas* originando uma variabilidade fenotípica particularmente interessante na progênie relacionado com a forma do fruto, cor do fruto, sementes e rendimento de óleo. Cruzamentos de *J. curcas* com as outras espécies mais distantes às vezes são bem-sucedidos e às vezes não, devido à existência de barreiras pré e pós-zigóticas que ainda estão sob investigação (Krishnan, Paramathma, 2009).

2.8 A biossíntese de ácidos graxos

O fato de os ácidos graxos serem moléculas orgânicas substancialmente mais reduzidas do que os carboidratos, a oxidação deles têm um elevado potencial para a produção de energia. Embora o metabolismo de ácidos graxos e lipídios em plantas apresenta muitas características em comum com outros organismos, as vias de lipídios em plantas são complexas e não totalmente compreendidas.

Figura 3- Síntese e metabolismo de lipídios ocorrem em várias organelas e em alguns casos envolve o movimento de lipídios de um compartimento celular a outro.

Fonte: Adaptado de (Buchanan et al., 2000)

Tal complexidade se deve a compartimentalização celular das vias e a extensiva intermistura de grupos de lipídios entre estes compartimentos (Figura 3). Deve-se considerar também o fato de que as plantas superiores coletivamente acumulam mais de 200 ácidos graxos distintos (Buchanan et al., 2000).

A biossíntese de ácidos graxos em plantas ocorre no interior dos plastídios, organelas estas que provavelmente se originaram de bactérias fotossintetizantes simbiotes e por esta razão talvez o metabolismo de ácidos graxos em plantas se assemelhe ao que ocorre nas bactérias. Durante a biossíntese de ácidos graxos uma série de reações repetidas incorporam grupos acetil de acetil-CoA num grupo acil de 16 ou 18 carbonos (Harwood, 1996).

As enzimas envolvidas nesta síntese são *acetyl-CoA carboxylase* (ACCCase) e a *fatty acid synthase* (FAS). O nome “ácido graxo sintase” refere-se a um complexo de várias enzimas individuais que catalizam a conversão de acetyl-CoA e malonyl-CoA nos ácidos graxos 16:0 (palmítico) e 18:0 (esteárico). É importante considerar que

acyl-carrier protein (ACP) é um cofator protéico essencial e é geralmente considerado como um componente da FAS (Ohlrogge, Jaworski, 1997).

A biossíntese de ácidos graxos é iniciada pela carboxilação do ATP dependente do acetil-CoA para a forma malonil-CoA. O grupo malonil é transferido junto a ACP, subsequentemente, a descarboxilação do radical malonil age para direcionar uma reação de condensação em que uma forma de ligação carbono-carbono entre C-1 de um acetato liga-se ao C-2 do grupo malonil no ACP. Esta cadeia de dois carbonos de extensão resulta inicialmente na formação do acetoacetil-ACP. Logo em seguida, ocorre uma sequência de três reações: redução; desidratação e redução novamente, levando a formação de Acil-ACP totalmente reduzido (Ohlrogge, Jaworski, 1997).

Esta sequência progride em três etapas a partir de um grupo 3-ketoacil para um grupo acil saturado, reação esta que é comumente encontrada em uma série de vias bioquímicas. Na β -oxidação e no ciclo do ácido cítrico, por exemplo, ocorre a mesma série de reações, porém, na ordem reversa (Ohlrogge, Jaworski, 1997; Buchanan et al., 2000).

Ácidos graxos de cadeias mais longas do que a do palmitato são formados por reações de alongação catalizadas por enzimas no lado citosólico da membrana do retículo endoplasmático. Estas reações adicionam duas unidades de carbono (*malonyl-CoA*) sequencialmente as extremidades carboxil de ambos substratos insaturados de ácidos graxos acyl CoA (Ohlrogge, Jaworski, 1997).

Para serem usados como combustível energético, os ácidos graxos precisam ser ativados e transportados na mitocôndria para degradação (β -oxidação). Os ácidos graxos são depois quebrados passo a passo em acetil-CoA, que depois é processada no ciclo do ácido cítrico, sendo convertida em energia (NADH, ATP) sobretudo pela ação da *acetyl-CoA carboxylase* que desempenha um importante papel na regulação da síntese e degradação dos ácidos graxos. Baixos níveis de acetil-CoA induzem a β -oxidação de ácidos graxos que resulta em ADH2, NADH e acetil-CoA (Ohlrogge, Jaworski, 1997).

Já o excesso de acetil-CoA resulta na produção de excesso de citrato (ciclo do ácido cítrico), que é exportado no citosol para dar origem ao acetil-CoA citosólico. Altos níveis de citrato significam que duas unidades de carbono e ATP estão disponíveis para síntese de ácidos graxos. Acetil-CoA pode ser carboxilado em malonil-CoA que é requerido para (i) síntese de flavonóides e poliquetídeos

relacionados, (ii) elongação de ácidos graxos para produzir ceras, cutícula, e óleos de sementes, e malonação de proteínas (iii) e outros fitoquímicos como terpenos, esteróides e esteróis (Fatland et al., 2005).

2.9 Toxicidade e biossíntese de ésteres de forbol

As plantas produzem uma vasta e diversa gama de compostos orgânicos, a grande maioria são aqueles que não participam diretamente do crescimento e desenvolvimento. Estas substâncias tradicionalmente são denominadas de metabólitos secundários ou produtos naturais, são frequentemente distribuídas entre grupos taxonômicos limitados dentro do reino vegetal (Figura 4). Muitas das suas funções permanecem desconhecidas e são melhores elucidadas com o aumento de sua frequência nas células.

Em contraste, os metabólitos primários como fitoesteróis, acil lipídeos, nucleotídeos, aminoácidos, ácidos orgânicos são encontrados em todas as plantas e realizam papéis que são essenciais e normalmente evidentes (Croteau et al., 1999).

Terpenóides também conhecidos como isoprenóides constituem uma grande classe de produtos naturais consistindo de unidades de isopreno (C₅). Existem duas vias biossintéticas para a construção de blocos terpenóides (isopentil difosfato (IPP) e dimetilalil difosfato (DMAPP)): 1) a via do mevalonato [MD:M00095] e 2) uma via alternativa ao do mevalonato ou MEP/DOXP [MD:M00096]. A ação de preniltransferases então gera os blocos de ordem mais elevada da construção: geranyl difosfato (GPP), farnesil difosfato (FPP) e geranylgeranyl difosfato (GGPP), que são os precursores dos monoterpenóides (C₁₀), sesquiterpenos (C₁₅) e diterpenóides (C₂₀), respectivamente (Figura 5). A condensação destes blocos de construção origina os precursores de esteróis (C₃₀) e de carotenóides (C₄₀). A via MEP/DOXP está ausente nos animais superiores e fungos, mas em plantas verdes as vias de MEP/DOXP e mevalonato co-existem em diferentes compartimentos celulares (Lange, Ghassemian, 2003).

A via MEP/DOXP, ocorre nos plastídios, e é responsável pela formação de monoterpenos, óleos essenciais e de acetato de linalil, alguns sesquiterpenos, diterpenos, os carotenóides e fitol. A via do mevalonato, que opera no citosol, dá origem a triterpenos, esteróis, e a maioria dos sesquiterpenos (Figura 6) (Lange, Ghassemian, 2003).

Figura 4- Vias do metabolismo secundário e exemplos das principais classes.

Fonte: Adaptado de Dewick (2009) e Taiz e Zeiger (2010).

Figura 5- Estrutura molecular das principais classes de terpenos.

Fonte: Adaptado de Dewick (2009) e Taiz e Zeiger (2010).

Os monoterpenóides (C10) são um grupo de terpenos que consiste de duas unidades de isopreno. Eles são derivados do geranil difosfato (GPP). A maioria dos monoterpenóides são óleos voláteis com aromas e sabores distintos, assim como óleos essenciais, turpentina, oleorosinas de plantas coníferas (Lange, Ghassemian, 2003).

Sesquiterpenóides (terpenóides C15) é um grupo de terpenos que consiste de três unidades de isopreno. Eles são derivados do farnesil difosfato (FPP) e podem ser ciclizados para produzir várias estruturas esqueléticas. A biossíntese de sesquiterpenos inicia-se com a perda do difosfato do FPP sob a ação de enzimas de síntese de sesquiterpenos, gerando um cátion alílico que é altamente susceptível a ataques intramoleculares. A ciclização do cátion farnesil pode ocorrer em qualquer uma das ligações duplas remanescentes com o resultado de que os anéis membros 6 -, 10 -, ou 11 podem ser formados. Muitos sesquiterpenos têm sido isolados a partir de plantas, fungos, organismos marinhos, e de espécies de *Streptomyces* (Sato et al.,1999).

Os diterpenos (C20 terpenóides), por sua vez são grupos de terpenos que consistem de quatro unidades isopreno. Eles derivam do geranilgeranil pirofosfato. Dois diferentes tipos fundamentais de ciclização enzimática ocorrem na transformação de GGPP em diterpenos. A primeira é semelhante às reações catalisadas pelas monoterpenos e sesquiterpenos sintases, nas quais a ciclização envolve a ionização de éster difosfato e o ataque da carbocação resultando numa ligação dupla interior do substrato geranilgeranil. O segundo tipo de ciclização é a da abietadieno sintase (Sato et al.,1999).

Figura 6- As vias de biossíntese de terpenos.

Fonte: Adaptado de Dewick (2009) e Taiz e Zeiger (2010).

Ésteres de phorbol são diterpenos altamente oxigenados produzidos por espécies de Euphorbiaceae, como a *Jatropha curcas* L. O phorbol, em particular, interage com domínios C1 (Mellor, Parker, 1998) da super família da proteína kinase C (Blumberg, 1988) que é conservada na grande variedade de espécies.

Sabe-se que os ésteres de forbol encontrados em sementes de *J. curcas* (Makkar et al., 1997) são poderosos irritantes e potentes promotores de câncer (Blumberg, 1988; Goel et al., 2007). Acessos com baixo ou zero forbol ocorrem em populações naturais, particularmente aquelas do México (Ferrari et al., 2009), e também têm sido encontrados em híbridos interespecíficos entre *J. curcas* e *J. integerrima* (Popluechai et al., 2009). Vale ressaltar que, *Jatropha platyphylla* Müll. Arg. é outra espécie de “zero forbol” do gênero *Jatropha* que pode ser usada para o melhoramento interespecífico (Makkar et al., 2011).

Geranyl difosfato synthase (GPPS), Farnesil difosfato sintase (FPPS) e Geranylgeranyl difosfato sintases (GGPPS) são enzimas chave acima das vias de biossíntese de monoterpenos, sesquiterpenos e diterpenos, respectivamente (Schmidt et al., 2010). A alteração dos níveis de expressão das *GGPPS* tem ajudado a definir mais claramente as influências desta enzima na regulação da biossíntese dos diterpenos em plantas (Lin et al., 2010).

Gomes et al. (2010), mostraram que o gene *GPPS* é superexpresso por um fator de ~25 em sementes de *J. curcas* em desenvolvimento quando comparado a folhas. Devido as grandes diferenças dos níveis de expressão de *GPPS* entre folhas e sementes, os autores sugeriram que o cDNA correspondente a este gene pode ser usado como sonda no melhoramento para QTLs de *J. curcas* associados com a síntese de forbol. Contudo, GPPS tem sido relacionada também com a via de biossíntese de citocininas (Abe et al., 2007), e o melhoramento para esta característica pode ter efeitos secundários imprevisíveis.

3 OBJETIVO GERAL

Pretende-se neste estudo associar a diversidade observada no BAG do IAC a caracteres genético-moleculares e fisiológicos, a saber, variações alélicas nos genes MFP2, KAS III e 3,N-D, seu perfil de expressão, composição do óleo e poder calorífico de cultivares contrastantes.

3.1 Objetivos específicos

Capítulo 01

- ✓ Identificar e analisar a diversidade alélica relacionada à 3 genes da síntese de óleo e ésteres de forbol numa amostra dos 10 acessos contrastantes do BAG do IAC.

Capítulo 02

- ✓ Analisar a expressão gênica diferencial entre 12 genótipos contrastantes de *Jatropha* do BAG do IAC para produtividade de óleo, e em diferentes estádios desenvolvimento considerando os diversos tecidos (folhas, flores e sementes de frutos em diferentes estádios).

Capítulo 03

- ✓ Analisar o perfil metabólico do óleo por meio de cromatografia gasosa com detector de ionização por chama (GC-FID) nos diferentes acessos deste estudo e correlacioná-lo com o perfil de expressão gênica e diversidade genética.

Capítulo 04

- ✓ Analisar o poder calorífico do óleo extraído para 12 genótipos contrastantes do BAG.

Capítulo 1

**DIVERSIDADE ALÉLICA DE GENES ENVOLVIDOS NA BIOSSÍNTESE DE ÓLEO
E DE TAXOL EM DIFERENTES GENÓTIPOS DO BAG-IAC**

4.1 Introdução e revisão de literatura

Conforme já discutido na seção anterior sobre a diversidade na espécie, *J. curcas* ainda está longe de ser uma cultura industrial e para que seu melhoramento seja bem sucedido, é crucial a disponibilidade de variabilidade genética para as características desejadas. Coleções de recursos genéticos diversos por meio da exploração mundial de germoplasma, introdução, caracterização e avaliação, poderão fornecer uma base sólida para o desenvolvimento de variedades elite pelo uso de vários métodos de melhoramento.

O progresso no melhoramento de plantas tem sido possível graças ao acúmulo de alelos benéficos a partir de variadas fontes genéticas vegetais existentes em todo mundo. O rápido acúmulo de sequências e dados de expressão nos bancos de dados genômicos, tornou possível a prospecção genética através de estratégias de PCR para alelos úteis de genes-chave em várias espécies que conferem resistência a estresses bióticos e abióticos, maior eficiência de utilização de nutrientes, melhoria da produtividade e melhoria da qualidade (Latha et al., 2004).

Embora a maioria das mutações seja deletérias, aproximadamente 0,1% delas levam a alterações numa função gênica que venha a ser necessária à sobrevivência da planta. *Allele mining* é uma abordagem promissora para dissecar a variação alélica natural de genes candidatos que controlam características agrônômicas de interesse e que tenham aplicações potenciais no melhoramento de plantas. Muitos alelos de resistência a doenças, por exemplo, são melhores expressos em espécies selvagens e foram perdidos durante a domesticação (Kumar et al., 2010).

Melhoristas de plantas devem considerar correlações entre os caracteres, seja para melhorar as características correlacionadas simultaneamente ou reduzir os efeitos colaterais indesejáveis via reprodução seletiva, ou seja, distinguir entre um caso simples de efeito aditivo, onde efeitos de alelos não apresentam interações, de casos mais complexos como os não-aditivos. Quando os efeitos genéticos não aditivos contribuem para a variação genética, estes efeitos e a variação genética associada podem ser utilizados para obter ganhos genéticos em características desejáveis através de métodos de reprodução seletiva (Cooper et al., 2009).

Gomes et al. (2010) em seu trabalho encontraram ESTs homólogos para a maioria das enzimas envolvidas na biossíntese de ácidos graxos em *J. curcas* tais como, acetil-CoA-carboxilase, 3-oxoacil- [proteína carreadora de acil] redutase,

enoil-redutase, ácido-graxo sintase e, em particular, para as enzimas envolvidas nos últimos passos da síntese de ácido oléico, esteárico e palmítico, ou seja, oleoil [proteína carreadora de acil] hidrolase, acil linoleico [proteína carreadora de acil]. Também foi encontrado por eles homologias para (i) alongamento de ácidos graxos na mitocôndria (ii) ligação dupla hidratação / desidratação, (iii) oxidoredutase; (iv) a acilação de glicerol e (v) modificação acylglycerol.

Além da biossíntese de ácidos graxos, Gomes et al, (2010) analisou vias metabólicas de compostos ativos (terpenos, quinonas e alcalóides) o que foi fundamental para o compreensão dos metabólitos secundários tóxicos, tais como o forbol e obviamente, fundamental para melhorar características agronômicas específicas.

Não obstante, neste estudo foi elucidado a expressão de alguns destes genes de interesse, e como uma continuidade destes achados, a presente investigação selecionou os genes da proteína multifuncional, ketoacil sintase III e 3-N-Debenzoil, cujos iniciadores já haviam sido desenhados por Gomes et al. (2010) para regiões curtas no interior das ESTs. O critério de escolha foi baseado em primeiro lugar na região previamente analisada e em segundo lugar pelo papel destes genes em suas vias metabólicas.

4.1.1 O Polimorfismo de SNPs

Polimorfismos de nucleotídeo único (Single Nucleotide Polymorphisms - SNPs) representam o tipo mais comum de variação de sequência nos genomas, embora tenham surgido recentemente como marcadores genéticos valiosos para revelar a história evolutiva das populações (Brumfield et al., 2003).

Ainda de acordo com Brumfield et al. (2003), sua ocorrência em todo o genoma também os torna ideais para análises de especiação e história demográfica, especialmente à luz da teoria recente que sugere que muitos loci não ligados a loci nucleares são necessários para estimar os parâmetros genéticos populacionais com confiança estatística. Apesar de terem menor variação em comparação aos microsatélites, os SNPs permitem fazer a comparação das diversidades genômica e histórias evolutivas de diferentes espécies.

Embora o uso de SNPs como marcadores em estudos de população ainda seja novo, métodos inovadores para a identificação de SNPs, triagem automatizada,

inferência de haplótipos e análises estatísticas fazem SNPs um marcador potencial para estudo de diversidade alélica em bancos de germoplasma.

A identificação de SNPs vai depender em grande parte do organismo de interesse. Existem várias estratégias para encontrar SNPs nas espécies tais como: (i) criação de iniciadores a partir de sequências conservadas de espécies relacionadas, que estão disponíveis online; ou (ii) através de clonagem (Karl, Avise, 1993) ou ainda métodos de PCR, como polimorfismos no comprimento de fragmentos amplificados (AFLPs) ou por meio de microssatélites (Primmer et al., 2002).

4.1.2 O gene da Proteína Multifuncional MFP2

A proteína multifuncional (MFP) da β -oxidação peroxissomal catalisa quatro reações separadas, duas das quais (2-trans-hidratase enoil-CoA e L-3-hidroxiacil-CoA-desidrogenase) são atividades essenciais necessárias para o catabolismo de todos os ácidos graxos.

Segundo Rylott et al. (2006), durante a germinação e crescimento pós-germinativo inicial em sementes oleaginosas, os ácidos graxos derivados do armazenamento do triacilglicerol são ativados em acil-CoA e depois convertidos em sacarose pelas ações sequenciais das vias da β -oxidação e ciclo do glioxilato no peroxissoma, e gliconeogênica no citosol. Esta ação fornece energia metabólica aos esqueletos de carbono para a germinação e início de crescimento pós-germinativo das plântulas (Kindl, 1987).

O gene MFP2 foi caracterizado inicialmente para *Arabidopsis thaliana*, ele possui 4481 pb, 18 éxons, 17 íntrons, uma pequena região 3'UTR e uma região 5'UTR, seu transcrito apresenta 2780 pb (Figura 7) (Rylott et al., 2006).

Figura 7- Representação da estrutura do gene MFP2 de *Arabidopsis thaliana* com seus 18 éxons e 17 íntrons.

A proteína codificada possui 3 domínios funcionais e exerce duas atividades, ou seja, atividade de N enoil-CoA hidratase (EC 4.2.1.17), atividade de 3-hidroxiacil-CoA desidrogenase e por isso, também está envolvida na elongação de ácidos graxos e biossíntese de ácidos graxos insaturados, esta última ocorrendo no retículo endoplasmático.

Figura 8- Representação dos domínios funcionais da proteína MFP2 de *Arabidopsis thaliana*.

Localiza-se no núcleo, parede celular e peroxissomos e é expressa em cerca de 24 estruturas de plantas durante 14 estágios de crescimento. O domínio 3-hidroxiacil-CoA desidrogenase [PubMed: 3479790] está envolvido no metabolismo de ácidos graxos, que catalisa a redução do 3-hidróxiacil-CoA em 3-oxoacyl-CoA. A maioria das células eucarióticas possuem 2 sistemas de β -oxidação de ácidos graxos, um localizado nas mitocôndrias e outro em peroxissomas. Nos peroxissomas a 3-hidroxiacil-CoA desidrogenase forma com enoil-CoA hidratase (ECH) e 3,2-trans-enoil-CoA isomerase (ECI) uma enzima multifuncional em que o domínio N-terminal tem as atividades de hidratase/isomerase e a C-terminal do domínio tem atividade de desidrogenase. Existem duas enzimas mitocondriais: uma que é monofuncional e a outra é, como o seu homólogo peroxissomal, multifuncional (Sato et al., 2007).

Figura 9- Atividade da MFP2 na via metabólica da “Biossíntese de ácidos graxos insaturados”, KEGG map 01040.

Figura 10- Atividade da MFP2 na via metabólica de “Elongação de ácidos graxos” que ocorre na mitocôndria e retículo, KEGG map 00062 adaptado.

4.1.3 O gene 3-Ketoacil-ACP Synthase III (KASIII)

O termo Fab (do inglês *Fatty acid biosynthesis*), designa um conjunto de enzimas envolvidas na conversão de acetil-CoA e malonil-CoA em ácidos graxos de cadeia longa. Fab H é codificada pelo gene *3-Ketoacil-ACP Synthase III* doravante (*KAS III*) que é um gene clusterizado com *Fab F* e codifica para a enzima 3-Ketoacil-ACP Synthase III de 33.5 KDa. Em *Escherichia coli*, Fab H catalisa o primeiro passo da biosíntese de ácidos graxos, que envolve a condensação de uma unidade acetil-CoA inicial com uma unidade malonil-ACP, formando assim acetoacetil-ACP (Figura 11). FabH de *E. coli* também tem a atividade de acetil-CoA:ACP transacilase (ACAT), que catalisa a formação de acetil-ACP a partir de acetil-CoA e ACP (Han et al., 1998).

É importante ressaltar que FabH não sintetiza ácidos graxos de cadeia longa, apenas C4 e traços de C6 ácidos-keto. Por isso, devido a essa especificidade foi

atribuído um papel a esta enzima na iniciação da síntese de ácidos graxos (Campbell, Cronan-Jr, 2001).

Figura 11- Atividade da enzima Fab H codificada pelo gene Ketoacil-ACP Sintase III na via metabólica de “Biossíntese de ácidos graxos” que ocorre nos plastídeos, KEGG map 00061.

De acordo com os resultados obtidos por Li et al. (2008), *KAS III* é um gene de cópia única no genoma de *J. curcas* e a alteração dos níveis de expressão da enzima deste gene tem ajudado a definir mais claramente a influencia dela na regulação da biossíntese de ácidos graxos em plantas.

4.1.4 O gene 3-N-debenzoil- 2-deoxitaxol N-benzoiltransferase

O produto natural taxol é um diterpenoide estruturalmente complexo composto de um núcleo taxano tricíclico contendo vários grupos aciloxi, incluindo o 13-O-(N-benzoil phenylisoserinoil) da cadeia lateral, o qual é um requisito estrutural para a eficácia do fármaco contra vários tipos de câncer (Walker et al., 2002).

Em particular, a função da cadeia lateral Nbenzoil é um componente estrutural necessário para a bioatividade crucial do Taxol que é a ligação aos heterodímeros

de tubulina, impedindo a montagem correta e a estabilidade dos microtúbulos o que pode interromper a divisão de célula (Walker et al., 2002).

A reação catalizada pela enzima codificada pelo gene 3'-N-D converte 10-Deacetilbaccatin III na presença de Acetil-CoA formando Baccatin III e CoA, que é o último diterpeno intermediário na via biossintética do taxol (Figura 12).

Figura 12- Atividade da enzima (2.3.1.167) 3-N-debenzoil- 2-deoxitaxol N-benzoiltransferase codificada pelo gene 3'-N-D na via metabólica de “Biossíntese de Diterpenóides” KEGG map 00904.

A proposta deste capítulo é identificar e analisar a diversidade alélica dos genes *MFP2* e *KASIII* relacionados à síntese de óleo e do gene 3'-N-D relacionado aos diterpenóides numa amostra dos 10 acessos do BAG do IAC em fragmentos de 200-350 pares de bases.

Estes 3 genes importantes nas vias biossintéticas de óleo e de taxol, foram selecionados para estudo de diversidade alélica em *J. curcas* a partir de sequências obtidas numa biblioteca de cDNA de sementes, que foi gerada e anotadas por Gomes et al. (2010) e obtidas a partir do banco de ESTs de *J. curcas* L. do NCBI.

4.2 Material e métodos

4.2.1 O Banco Ativo de Germoplasma do IAC

O Instituto Agronômico de Campinas (IAC) dispõe, em seu BAG, de mais de 1076 genótipos provenientes de diferentes regiões geográficas que incluem: nove estados brasileiros (Alagoas, Bahia, Ceará, Mato Grosso do Sul, Minas, Gerais, Pará, Rio Grande do Norte, São Paulo e Tocantins) e regiões da China, Costa Rica, Índia e México. Dispõe ainda de acessos de mais seis espécies congêneres (*J. integerrima*, *J. multifida*, *J. podagrica*, *J. gossypifolia* (pinhão-roxo), *J. pohliana* (pinhão-bravo) e *Jatropha pandureaefolia*).

Além disso, o programa de melhoramento genético tem gerado novos genótipos para a coleção do IAC. Atualmente são: 1003 indivíduos de primeira geração de autofecundação (S1); 187 indivíduos de segunda geração de autofecundação (S2); 36 híbridos intraespecíficos F1 (*J. curcas*/*J. curcas*); 130 híbridos interespecíficos F1, sendo 113 entre *J. curcas* e *J. integerrima*, 16 entre *J. curcas* e *J. multifida* e apenas um entre *J. curcas* e *J. podagrica*. Há ainda 106 plantas de retrocruzamentos de primeira geração (RC1F1): 102 *J. curcas*/*J. curcas*/*J. integerrima* e quatro *J. curcas*/*J. curcas*/*J. multifida* e mais de 475 plantas de RC2F1 (*J. curcas*/*J. curcas*/*J. curcas*/*J. integerrima*).

Também estão disponíveis plantas regeneradas de embriões somáticos induzidos a partir do cultivo in vitro de embriões zigóticos imaturos resgatados de cruzamentos entre parentais incompatíveis de *J. curcas* e *J. integerrima*, *J. curcas* e *J. podagrica*, *J. curcas* e *J. multifida*. A maior parte do BAG está instalada em campo (Figuras 13 e 14), situado na cidade de Campinas, São Paulo, a 22°54'20" latitude sul e 47°03'39" longitude oeste. Alguns híbridos interespecíficos continuam em vasos (Figura 15) para melhor controle dos cruzamentos realizados.

Ademais, genótipos previamente avaliados pela equipe do IAC e classificados como contrastantes para teor de óleo e de ésteres de phorbol, também foram disponibilizados para o presente estudo. Considera-se baixo nível de phorbol, os genótipos que apresentaram valores próximos ao encontrado em acessos atóxicos mexicanos (0,11-0,27 mg/g) (Sadubthummarak et al., 2013). Alguns acessos mexicanos, recém-introduzidos no BAG do IAC, apresentaram valores nulos de

forbol (nenhum pico foi encontrado nas avaliações por HPLC) (dados não publicados).

Figura 13- Mapa do banco de *J. curcas* do IAC com a indicação de cada indivíduo em campo e a respectiva origem geográfica.

Figura 14- Cultivo em Campo na Fazenda Santa Elisa (IAC) de 2000 plantas pertencentes a 102 acessos de *J. curcas* L. oriundos de 26 regiões geográficas. (a) e (b) mostram a plantação na estação seca (foto tirada em 21.09.2011). (c) e (d) mostram a plantação na estação chuvosa (período vegetativo- imagem de 23.11.2012).

Figura 15- (a) 108 híbridos F1; (b) 124 retrocruzamentos; (c) 6 genótipos selvagens (1- *J. podagrica*; 2- *J. multifida*; 3- *J. integerrima*; 4- *J. pandurifolia*; 5- *J. pohliana*; 6- *J. gossypifolia*) do BAG IAC.

4.2.2 A Seleção do Material Vegetal do BAG

A seleção do material para este capítulo foi baseada em avaliações anteriores realizadas pela equipe do IAC que consideraram: caracteres morfológicos (altura, diâmetro do caule, número de ramificações basais, etc); produção de frutos e de óleo e conteúdo do diterpeno tóxico (ésteres de forbol). Priorizou-se, assim, a seleção de um conjunto vasto e que fosse representativo da variedade do banco para estas características.

Inicialmente foram coletadas folhas jovens de 50 genótipos de *J. curcas* do Banco de Germoplasma do IAC, mantidos em condições de campo (in vivo) e procedentes de diferentes regiões do Brasil e do exterior para realização da extração de DNA (Tabela 1). As folhas eram coletadas e prontamente congeladas e armazenadas em ultrafreezer -80 °C. Todo o material foi usado para extração de DNA e amplificações e posteriormente foram selecionados aleatoriamente apenas 10 genótipos deste total para a clonagem dos fragmentos dos alelos.

Tabela 1- Identificação dos 50 genótipos de *J. curcas* do Banco de Germoplasma do (IAC). Em amarelo os genótipos selecionados para clonagem e sequenciamentos dos fragmentos.

	<i>Planta ID</i>	<i>Acesso</i>	<i>Coleta</i>
1	<i>J. integerrima</i>	Selvagem	21.09.11
2	<i>J. podagrica</i>	Selvagem	21.09.11
3	<i>J. multifida</i>	Selvagem	21.09.11
4	L13P30	P8	21.09.11
5	PARÁ 6	Pará	21.09.11
6	L9P44	Não especificado	21.09.11
7	MÉXICO ATPL5	México	21.09.11
8	L8P54	A5	21.09.11
9	PARÁ 5	Pará	21.09.11
10	1	Retro 1	21.09.11
11	91	Retro 1	21.09.11
12	L1P24-2 ROXA	Híbrido F1	21.09.11
13	74	Retro 1	21.09.11
14	L6P7	A1	21.09.11
15	L9P49	A2	14.12.11
16	L13P20	Não especificado	21.09.11
17	L6P11	A1	21.09.11
18	L12P52	A4	21.09.11
19	L13P25	P7	21.09.11
20	L12P51	P1	21.09.11

21	L13P4	P5	21.09.11
22	L1P26-A china	China	21.09.11
23	L4P49	A8	21.09.11
24	25	Retro 1	21.09.11
25	L4P19	A8	21.09.11
26	L2P23	A6	14.12.11
27	L2P19	A6	14.12.11
28	L1P7	A6	14.12.11
29	MÉXICO Q153/11 A4	México	14.12.11
30	MÉXICO Q153/11 A3	México	14.12.11
31	MÉXICO Q153/11 A20	México	14.12.11
32	L6P25	A1	14.12.11
33	L6P31	A1	14.12.11
34	L10P5	A2	14.12.11
35	L12P4	A3	14.12.11
36	L12P2	A3	14.12.11
37	L9P1	A9	14.12.11
38	L9P32	A9	14.12.11
39	L11P5	A20	14.12.11
40	L12P8	A7	14.12.11
41	L12P9	A16	14.12.11
42	L4P44	A19	14.12.11
43	L4P50	Não especificado	14.12.11
44	L13P48	P10	14.12.11
45	L2P37-2	Híbrido F1	14.12.11
46	9	Retro 1	14.12.11
47	64	Retro 1	14.12.11
48	37	Retro 1	14.12.11
49	EMBRIÃO 4	curcas x integerrima	14.12.11
50	L2P7-A	China	14.12.11

4.2.3 Extração de DNA

O DNA genômico total foi extraído a partir de folhas jovens destes indivíduos segundo o método CTAB com pequenas modificações ver (Gomes, 2009 - dissertação de mestrado). Aproximadamente 1 g de tecido de folha por indivíduo foi triturados em nitrogênio líquido, homogeneizadas em 0,7 ml do tampão de extração (2% CTAB, 20 mM EDTA, PVP 1%, 1.4 M NaCl, 100 mM Tris-HCl pH 8.0 e β -mercaptoetanol 0,2%), e incubado à 65°C durante 30 min com agitação de 10 em 10 min. A essa mistura foi adicionado 0,7 ml de (clorofórmio:álcoolisoamílico 24:1) que foi misturada por inversão durante 5 min e submetida a centrifugação por 10 min. O sobrenadante foi transferido para um outro tubo e novamente foi adicionado 0,7 ml de (clorofórmio:álcoolisoamílico 24:1) e misturado por inversão durante 5 min e

submetido a centrifugação por 10 min. A fase superior foi transferida para um novo tubo e submetida a precipitação com 0,6 V de isopropanol de um dia para o outro.

Após esse período as amostras foram centrifugadas por 15 min e o pellet formado foi lavado com etanol 70%. As amostras foram ressuspensas em 100 µl de TE (Tris EDTA 10X). Esse conteúdo foi tratado com RNase A (10 µg/mL, Fermentas) e incubado a 37 °C por 30 min. A partir dessa etapa as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 0,8% em TAE 0,5X, durante 30 min e quantificada por NanoDrop.

4.2.4 Os domínios funcionais dos ESTs em estudo

Foram selecionados para este estudo de genômica desta tese 3 genes. Destes, dois estão envolvidos na biossíntese e metabolismo de ácidos graxos e um envolvido na biossíntese de diterpenos. As sequências analisadas foram geradas e anotadas por Gomes et al. (2010) e obtidas a partir do banco completo de 40.000 ESTs de *J. curcas* L. do NCBI (Tabela 3).

Tabela 2- Características das quatro ESTs selecionadas para o estudo.

EC	Homologia-KEGG	Metabolismo	Tamanho, aa	Tamanho-Homologia, aa	Identidade (%)
1.1.1.211	Multifunctional protein MFP2	Elongação de Ácidos graxos; Biossíntese de ácidos graxos insaturados	725	258	84
2.3.1.167	3'-N-debenzoyl-2'-deoxytaxol N-benzoyltransferase	Biossíntese de Diterpenoides; Biossíntese de terpenoides e esteróides	446	86	89
2.3.1.41	Ketoacyl-ACP Synthase III	Biossíntese de Ácidos Graxos	400	158	91

4.2.5 Desenho dos iniciadores

Os iniciadores foram desenhados utilizando o software PRIMER Designer 2.0, atendendo as recomendações para seu uso em PCR em tempo real com amplicons resultantes curtos de até no máximo 250 pb. As características de cada iniciador usado neste estudo estão descritas na Tabela 3. A escolha de trechos curtos para

análise da diversidade foi feita em virtude do estudo prévio com os iniciadores por PCR em tempo real feito por (Gomes et al., 2009).

Tabela 3- Características dos iniciadores desenhados para cada gene.

Nome do primer	Sequencia F e R	Tamanho do produto (pb)	TM (°C)	TA (°C)
<i>Multifunctional protein MFP2</i>	5'-CTCGACAGGCTTCATTACA-3' 5'-TGCAAGAGGACAAGAGAGCA-3'	213	74	51
<i>3'-N-debenzoyl-2'-deoxytaxol N-benzoyltransferase</i>	5'-TGAGTGGCTTCACAGATTGG-3' 5'-GGTACAACACTTCCAAGTAG-3'	102	73	47
<i>Ketoacyl-ACP Synthase III</i>	5'-CCAAGTTAGACCAGCTCCAA-3' 5'-GCAGTTGCGACACGATTAGA-3'	174	75	51

4.2.6 Amplificação dos loci via PCR

As reações de PCR foram realizadas da seguinte maneira: 10,0 µL 5X GO Taq Buffer (promega); 3,0 µL de MgCl₂ 25 mM (promega); 1,0 µL de dNTPs 10 mM (promega); 1,25 µL de primer F (10 µM); 1,25 µL de primer R (10 µM); 0,25 µL da GoTaq DNA polimerase (5 µ/µL) (promega); 32,25 µL de H₂O Milli-Q e 1,0 µL de DNA molde (400 ng/µL), completando um volume final de 50 µL. As condições das reações foram: 95 °C por 4 min; 30 ciclos de 95 °C por 30s; 50 °C por 30s; 72 °C por 2 min e mais 72 °C por 7 min e 15 °C para finalizar. As reações foram realizadas em termociclador *Applied Biosystems* (Veriti 96-well *Thermal Cycler*) em placas de 96 poços e a temperatura de anelamento foi de 50 °C para todos os primers.

4.2.7 Clonagem dos fragmentos genômicos obtidos por PCR

Os amplicons foram ligados ao vetor pGEM-Teasy (Promega) de acordo com as recomendações do fabricante. Cerca de 2 µL da ligação foi usada na transformação das células eletrocompetentes DH10β. Na câmara de fluxo laminar, foram adicionados numa cuveta estéril BIO-RAD Gene Pulser cuvette 0,2 cm electrode, previamente resfriada, 30 µL de célula eletrocompetente e posteriormente 2 µL da ligação. A mistura foi eletroporada em BIO-RAD *Micro Pulser*TM utilizando-se o programa EC2 (*Escherichia coli* 2) com um pulso (±2.5 KV em 4,8 ms). Em seguida foi adicionado à cuveta 200 µL de meio SOC e a amostra foi transferida para tubos

contendo 800 µL de SOC, esses tubos foram incubados à 37 °C durante uma hora e 200 rpm. Após esse período, foi feito um plaqueamento de 150 µL da transformação em placas pequenas contendo 30 ml de LB/Agar e AMP(100 µg/ml); IPTG (250 µg/ml) e X-Gal (40 µg/ml).

Essas placas foram incubadas em BOD à 37 °C durante 16h. As culturas permanentes foram feitas em placas de Elisa fundo U, contendo 70 µL de meio LB com Amplicilina 100 mg/mL e crescidas à 37 °C e 260 rpm durante 16h. Após esse período as placas foram: centrifugadas por 3 min; acrescidas de 70 µL de glicerol 50%; seladas, identificadas e estocadas em ultrafreezer à -80 °C. Para a extração de DNA plasmidial, foram selecionados de cinco a 10 clones de cada genótipo para tentar o isolamento de todas as variantes alélicas de cada planta.

O inóculo de cada clone foi feito utilizando-se replicador de 96 pinos em placa *Deepwell* contendo 1200 µL de meio LB+Amplicilina em cada poço. As placas foram incubadas em shaker à 37 °C e 260 rpm por 15 h. Após o crescimento, foram feitos as mini-preps em placa segundo as recomendações de (Sambrook et al., 1989). As amostras de DNA plasmidial foram ressuspensas em 50 µL de água Milli-Q autoclavada.

4.2.8 Sequenciamento e montagem

O sequenciamento foi realizado em um seqüenciador ABI 3730 Genetic DNA Analyzer, da Applied Biosystems, com reações de sequenciamento e precipitação de acordo com os protocolos sugeridos pela empresa. As seqüências e os cromatogramas foram primeiramente visualizados no programa *Sequencing Analysis* (ABI PRISM). A triagem de qualidade e a eliminação do vetor foram feitas com os programas Phred-Phrap/Cross-match com *score* mínimo de qualidade 20, ou seja, a qualidade Phrap final de consenso igual ou superior a 20 e a taxa de erro igual ou inferior a 1 base a cada 10 kb. As seqüências *Foward* e *Reverse* consenso dos clones genômicos foram montadas usando o software CAP3 Sequence Assembly Program (<http://pbil.univ-lyon1.fr/cap3.php>).

4.2.9 Análise de polimorfismos de SNPs e Estudo de Diversidade Alélica

4.2.9.1 Determinação dos haplótipos

Para a discriminação dos haplótipos, os *contigs* montados foram inicialmente alinhados com a ferramenta BLASTX para verificação da correspondência com a proteína desejada. Após esta etapa, as sequências foram alinhadas e analisadas em fase com o quadro de leitura quanto a presença de polimorfismos de base única e a implicação destes polimorfismos na sequência de aminoácidos da proteína. Com o uso da ferramenta *Clustal Omega Multiple Alignment*, foram feitas as análises de discriminação dos estados alélicos.

Primeiramente, foi feito um alinhamento múltiplo intragenótipo, ou seja, entre todos os *contigs* de um mesmo genótipo contra a sequência genômica de referência de cada gene para verificação da variação interna. Após esta análise foi feito o alinhamento intergenótipo, ou seja, entre todos os *contigs* de todos os genótipos contra as respectivas sequências genômicas de referência. Nestes alinhamentos foram escolhidas “janelas” de análises, trechos de pelo menos 100 pb conservados entre as sequências.

4.2.9.2 Medidas de diversidade

As análises de diversidade molecular e filogenia foram feitas com o uso dos *softwares* DNASP V5 (Librado, Rosas, 2009) e MEGA version 6 (Tamura et al., 2013). A diversidade em termos de proteínas codificadas foi determinada após a tradução dos *contigs* e procedimento de alinhamento feito com o *ClustalW Multiple Alignment*.

4.3 Resultados

4.3.1 Extração de DNA genômico

O protocolo de extração CTAB que já havia sido padronizado por Gomes et al. (2009) para *J. curcas* L. funcionou bem para os 50 indivíduos pré-selecionados conforme a qualidade mostrada dos DNAs quando resolvidos em gel de agarose 0.5% em TBE 0.5X (Figura 16).

Figura 16- DNA genômico de 50 genótipos de *Jatropha* do Banco Ativo de Germoplasma do IAC (Instituto Agronômico de Campinas) resolvidos em gel de agarose 1% em tampão TBE 0.5X. (A) Plantas de 1 a 25 (B) Plantas de 26 a 50. Destacado em rosa os 10 indivíduos selecionados para as clonagens.

(A)

(B)

4.3.2 Amplificação dos Loci

Inicialmente foi utilizado apenas um genótipo (L13P30) para a PCR de verificação dos iniciadores. Os iniciadores para *MFP2*, *KAS III* e *3'-N-D* amplificaram uma única banda, conforme (Figura 17). *KAS III* e *3'-N-D* apresentaram seus amplicons dentro do tamanho esperado, ao passo que *MFP2* apresentou um amplicon de 600 pb enquanto se esperava um amplicon de 213 pb. Como estes iniciadores foram desenhados com base em sequências expressas ESTs, o trecho amplificado para este gene podia conter um íntron; esta hipótese foi confirmada como será vista adiante na predição da estrutura do gene *MFP2* para *J. curcas*.

Figura 17- PCR de verificação dos iniciadores (*MFP2*, *3'-N-D* e *KAS III*) e dos amplicons gerados. O DNA genômico utilizado foi o do genótipo L13P30 de *J. curcas* do BAG do IAC. O gel apresentado foi feito em agarose 1% em tampão TBE 0.5X corado com gel red.

Após o teste para verificação dos amplicons, os loci estudados neste capítulo foram amplificados no conjunto de 50 genótipos (Figura 18 a e b), dos quais 10 foram utilizados na clonagem destes fragmentos para análise da diversidade alélica, os genótipos estão destacados na (Figura 18a e b).

Figura 18- PCR de verificação do iniciador MFP2 amplificado com DNA de 50 genótipos do BAG-IAC. O gel apresentado foi feito em agarose 1% em tampão TBE 0.5X. As caixas vermelhas em A e B indicam os amplicons selecionados para clonagem e sequenciamento.

Figura 19- PCR de verificação do iniciador *KAS III* amplificado com DNA de 50 genótipos do BAG-IAC. O gel apresentado foi feito em agarose 1% em tampão TBE 0.5X. As caixas vermelhas em A e B indicam os amplicons selecionados para clonagem e sequenciamento.

Figura 20- PCR de verificação do iniciador 3'-*N-D* amplificado com DNA de 50 genótipos do BAG-IAC. O gel apresentado foi feito em agarose 1% em tampão TBE 0.5X. As caixas vermelhas em A e B indicam os amplicons selecionados para clonagem e sequenciamento.

4.3.3 Identificação dos haplótipos e diversidade alélica nos genótipos de *J. curcas*

Para facilitar a interpretação dos resultados, os 10 genótipos separados para o estudo foram classificados segundo as diferentes origens geográficas ou por serem derivados de cruzamentos do programa de melhoramento genético do IAC (Tabela 5 e Figura 19).

Tabela 4- Genótipos de *J. curcas* classificados de acordo com a origem geográfica e utilização em programa de melhoramento genético.

Genótipo	Procedência
L1P24-2	Híbrido-F1
México Q153-A4	México
Pará 6	Pará
L2P7-A	China
L2P37-2	Híbrido F1
L9P32	Bahia
L4P49	São Paulo
L12P51	Pernambuco
L9P1	Bahia
L13P25	Pernambuco

Figura 21- Distribuição geográfica dos 10 genótipos de *J. curcas* do BAG estudados quanto à diversidade alélica.

4.3.3.1 Gene da Proteína Multifuncional 2 (MFP2)

A região escolhida para análise dos haplótipos neste gene foi um trecho de 213 pb dentro da etiqueta transcrita (*Expressed Sequence Tag* - EST), no entanto

após os ensaios com estes iniciadores verificou-se a amplificação de um fragmento de 600 pb em todos os genótipos, conforme a Figura 18 a e b, levando-se a conclusão de que a região genômica abrangida por estes iniciadores poderia conter um íntron. Isso foi parcialmente confirmado posteriormente com a predição da estrutura do gene para *J. curcas* (Figura 22) na comparação das homologias das ESTs com a sequência genômica (Jcr4S00616). Teoricamente, os fragmentos analisados para diversidade alélica no gene MFP2 abrangiram uma região intrônica entre os éxons 1 e 2. Podemos supor que este caso não é de um íntron traduzido, mas sim de mutações (in/del) na junção intron-éxon consenso nas bordas esquerda e direita (8-10 pb) de cada lado do íntron que é reconhecida pelo spliceossomo.

Figura 22- Predição da estrutura do gene MFP2 obtida pelas homologias do alinhamento entre as ESTs de sementes (Gomes et al., 2010) contra o genoma de *J. curcas* L..

Estudos mais aprofundados envolvendo o genoma poderão revelar com mais precisão se se trata de erros do sequenciamento do genoma (Sato et al., 2011) ou da anotação da proteína no NCBI que pode ter vindo de um modelo markoviano, ou obtida *in vitro* e anotada após extração de proteína e injeção em espectro de massas, o que daria mais certeza de que a anotação estaria correta.

As análises de identificação dos haplótipos para este gene foram feitas seguindo o conceito de que sequências de DNA variáveis em um locus dentro de uma espécie representa diferentes alelos que estão presentes em uma população. Primeiramente os fragmentos de um mesmo genótipo foram alinhados entre si, determinando a variação interna, ou intra-genótipo. Nesta análise o genótipo L1P24-2, um híbrido F1 do BAG resultante do cruzamento de uma variedade selvagem *J. integerrima* (pai doador de pólen) com *J. curcas* (mãe receptora de pólen) apresentou 5 haplótipos para a região. Já os genótipos “Pará 6” e “L9P1”,

apresentaram 3 e 4 variantes respectivamente (Figura 23), ao passo que os demais genótipos apresentaram dois haplótipos.

Figura 23- Variação intra-genotípica do gene MFP2 obtida após alinhamento múltiplo entre as sequências de um mesmo genótipo. A figura ilustra o número de alelos encontrados para cada indivíduo.

Num segundo momento foi feita a análise de diversidade inter-genótipo, onde todos os contigs dos *reads* de sequenciamento do gene em todos os genótipos foram alinhados uns contra os outros. Ao todo foram alinhadas 129 sequências incluindo a sequência genômica de referência (Sato et al., 2011), a janela de análise foi a região conservada de 134pb (posição 278-412) a partir de 10 indivíduos do BAG. Foram encontradas 79 mutações ou polimorfismos de SNPs e um total de 8 haplótipos (estados alélicos) foram identificados nos 10 genótipos analisados (Figura 24).

A região intrônica usada para identificar os haplótipos foi analisada com BLASTX e todos os trechos deram homologia com a Proteína Multifuncional com alto índice de similaridade (Dados não mostrados). Por isso, também foi feito o alinhamento múltiplo da tradução dos trechos, mostrando os arranjos das diferentes configurações proteicas codificadas pelos haplótipos. Dessa forma foram encontradas sete configurações proteicas distintas para os 8 haplótipos de MFP2 (Figura 25).

Figura 24- Janela de análise do alinhamento múltiplo dos contigs do gene MFP2 gerado pela ferramenta *Clustal Omega Multiple Alignment*. A figura mostra a região conservada de 135 pb usada na identificação do gene MFP2. As estrelas em preto e os retângulos coloridos representam os 8 haplótipos identificados para o locus e caixa vermelha indica a sequência genômica de referência.

Figura 25- Janela de análise do alinhamento múltiplo da tradução dos contigs do gene *MFP2* na frame 1, gerado pela ferramenta *Clustal Omega Multiple Alignment*. Os retângulos coloridos e as estrelas representam as diferentes proteínas produzidas pelos haplótipos.

Utilizando a mesma janela para análise da região conservada do alinhamento com 134 pb, foram determinadas as relações filogenéticas entre os grupos de haplótipos (Figura 26). A análise filogenética destas regiões permitiu a divisão dos 8 alelos de MFP2 em 2 grupos A e B. Considerando a origem geográfica (procedência) de cada um, é possível observar um evento de duplicação de um alelo ancestral, provavelmente Mexicano (o Mexico sendo o centro de origem da espécie) que resultou em dois subgrupos A e B. Os haplótipos 1, 2 e 3 são mais próximos filogeneticamente (Grupo A) e podem constituir parálogos duplicados. Também, os haplótipos 4, 5, 6, 7 e 8 são mais próximos entre si (Grupo B). A dispersão destes alelos indica a existência de diversidade genética nesses genótipos, e o seu conhecimento pode ser utilizado incrementar a base genética do germoplasma do programa de melhoramento do IAC na busca por uma cultivar.

Figura 26- Árvore filogenética inferida para o gene MFP2 usando o método Neighbor-Joining (Saitou, Nei, 1987). As distâncias evolutivas foram calculadas usando o método de máxima verossimilhança (Tamura et al., 2004). e estão em unidades do número de substituições de bases por local. As análises foram realizadas com o programa MEGA6.

4.3.3.2 Gene *Ketoacil-ACP-sintase III (KAS III)*

O mesmo procedimento de análise de diversidade descrito na seção anterior foi seguido para o gene *KASIII*. A região analisada deste gene corresponde a um trecho de 174 pb dentro de um éxon, conforme pode ser visto na estrutura predita para o gene *KAS III* no genoma de *J. curcas*. A estrutura também foi construída com base nas homologias das ESTs analisadas contra o genoma de *J. curcas* recém-publicado (Sato et al., 2011, Figura 27).

Figura 27- Predição da estrutura do gene *KASIII* obtida pelas homologias do alinhamento entre as ESTs de sementes (Gomes et al., 2010) contra a sequência genômica de *Jatropha curcas* L..

Para *KAS III*, foram recuperadas e alinhadas 37 sequências (contigs montados), incluindo a sequência genômica de referência (Sato et al., 2011) a partir de 10 indivíduos do BAG. Ao todo foram encontradas 50 variantes de SNPs numa janela de análise de 120 pb (posição 548 a 670), e 10 haplótipos presentes nos 10 genótipos analisados (Figura 29).

A variação interna, isto é intra-genótipo, pode ser observada na figura 28 onde se tem o número de haplótipos distintos apresentado por cada indivíduo. Os genótipos Pará 6 e L2P37-2 apresentaram dois haplótipos, L2P7-A, um acesso da china apresentou 3 haplótipos, e L1P24-2 e L9P32, dois haplótipos cada.

Figura 28- Variação intra-genotípica do gene *KAS III* obtida após alinhamento múltiplo entre as sequências de um mesmo genótipo. A figura ilustra o número de alelos encontrados para cada indivíduo.

A variação inter-genótipo revelou os estados alélicos encontrados para as 10 plantas estudadas. Os genótipos mexicanos Q153/11 A4, L9P32, L2P37-2 e L1P24-2 apresentaram um haplótipo idêntico a sequência genômica de referência (Figura 29).

Figura 29- Janela de análise do alinhamento múltiplo dos contigs do gene *KAS III* gerado pela ferramenta *Clustal Omega Multiple Alignment*. A figura mostra a região conservada de 120 pb usada na identificação dos estados alélicos do gene *KAS III* (Ketoacil-ACP-sintase III). As estrelas em preto e os retângulos coloridos representam os 8 haplótipos identificados para o *locus* e caixa verde indica a sequência genômica de referência.

A partir da tradução dos trechos foram encontradas 6 proteínas distintas codificadas por estes haplótipos, o que pode ser indício de diversidade no banco para o gene *KASIII* (Figura 30). Análises mais aprofundadas do gene poderão apontar se estas proteínas apresentam modificações estruturais em seus domínios catalíticos e consequentemente em suas atividades.

A região conservada de 120 pb foi utilizada na determinação das relações filogenéticas entre os grupos de haplótipos (Figura 31). A árvore filogenética construída revela a proximidade entre os haplótipos do grupo A haplótipos de 1 a 6, que são os mais próximos taxonomicamente, agrupando-se em um mesmo cluster, o que significa que eles divergiram de um mesmo ancestral. Os haplótipos do grupo 2, embora sendo materiais do Brasil ficaram separados em um grupo independente. Os haplótipos do México são filogeneticamente mais próximos de um dos chineses

(L2P7-A) e dos híbridos F1 analisados em relação aos dos brasileiros (Pará6, L9P1, L4P49 e L9P32). A árvore revela também que alguns cultivares são homozigotos e outros heterozigotos para este locus conforme destacado na figura 31.

Figura 30- Janela de análise do alinhamento múltiplo da tradução dos contigs do gene KAS III na frame 1(Emboss Transeq), gerado pela ferramenta *Clustal Omega Multiple Alignment*. Os retângulos coloridos representam as diferentes proteínas produzidas pelos haplótipos.

Figura 31- Árvore filogenética inferida para o gene *KAS III* usando o método Neighbor-Joining (Saitou, Nei, 1987). As distâncias evolutivas, foram calculadas usando o método de máxima verossimilhança (Tamura et al., 2004) e estão em unidades do número de substituições de bases por local. As análises foram realizadas com o programa MEGA6.

4.3.3.3 Gene 3'-N-debenzoyl-2'-deoxitaxol N-benzoyltransferase (3'-N-D)

A região analisada deste gene corresponde a um trecho de 102 pb localizado dentro de um éxon, conforme pode ser visto na estrutura predita para o gene 3'-N-D no genoma de *J. curcas*. Assim como nos outros dois genes estudados, a estrutura de 3'-N-D também foi predita com base nas homologias dos ESTs analisados a sequência genômica correspondente (Sato et al., 2011) (Figura 32).

Figura 32- Predição da estrutura do gene 3'-N-D obtida pelas homologias do alinhamento entre as ESTs de sementes (Gomes et al., 2010) contra a sequência genômica de *Jatropha curcas* L..

Ao todo foram alinhadas 188 sequências e o polimorfismo de SNPs foi analisado em uma janela de 93 pb (posição 1 a 94). A janela de análise apresentou 69 variantes de SNPs e um total de 26 haplótipos presentes nos 10 genótipos analisados (Figura 34).

A variação interna para o gene 3'-N-D pôde ser observada na figura 33 onde se tem o número de haplótipos distintos apresentado por cada indivíduo. O genótipo L2P7-A não teve sequências recuperadas para este gene.

Figura 33- Variação intra-genótipica do gene 3'-N-D obtida após alinhamento múltiplo entre as sequências de um mesmo genótipo. A figura ilustra o número de alelos encontrados para cada indivíduo.

Os genótipos Pará 6, L2P37-2, que é um híbrido F1 e o genótipo L4P49, apresentaram um elevado número de haplótipos para o locus conforme mostrado na (Figura 33). A diversidade inter-genótipo foi verificada do alinhamento múltiplo entre todas as sequências de todos os genótipos (Figura 34).

A diversidade de proteínas encontradas para os trechos traduzidos é representada na (Figura 35), onde pelo menos 20 proteínas distintas são codificadas pelos trechos, o alinhamento mostra que algumas proteínas são mais conservadas,

L1P24-219/1-82	A.....C.....A.....
L1P24-219a/1-82	A.....C.....A.....
L1P24-219b/1-82	A.....C.....A.....
L1P24-246/1-82	A.....C.....A.....
L1P24-246a/1-82	A.....C.....A.....
L1P24-246b/1-82	A.....C.....A.....
L1P24-220/1-82	A.....C.....A.....
L1P24-225/1-82	A.....C.....A.....
L1P24-226/1-82	A.....C.....A.....
L1P24-24/1-81	A.....C.....A.....
3-N-D/1-82	A.....C.....AA.....
L1P24-2a/1-82	A.....C.....A.....
L13P2510/1-83	C.....GT.G.....AGT.G.T.G.A.....
L13P2511/1-82	C.....A.....
L13P2514/1-82	C.....A.....
Para612/1-82	C.....A.....
Para617/1-82	C.....A.....
Para619/1-82	C.....A.....
Para625a/1-82	C.....A.....
Para65/1-82	C.....A.....
Para67a/1-82	C.....A.....
Para6011a/1-82	C.....A.....
L1P24-29/1-81	A.....C.....GTAC.T.G.....AGT.G.T.G.A.....
L4P4929/1-82	C.....A.....
L1P24-2b/1-82	C.....A.....
L1P24-2c/1-82	C.....A.....
L1P24-22a/1-81	C.....A.....
L1P24-22c/1-81	C.....A.....
L1P24-22d/1-82	C.....A.....
Para612b/1-82	C.....A.....
Para613/1-82	C.....A.....
Para614/1-82	C.....A.....
Para615/1-82	C.....A.....
Para616/1-82	C.....A.....
Para66/1-82	C.....A.....
Para67/1-82	C.....A.....
Para67c/1-82	C.....A.....
Para6011b/1-81	C.....A.....
L1P24-22/1-82	C.....A.....
L1P24-227/1-81	C.....A.....
L1P24-25/1-81	C.....A.....
L4P4910/1-81	C.....A.....
L4P4913/1-80	GCA.....AC.....C.....
MexicoQ153a420/1-81	G.A.T.....CA.....C.....GTAC.T.G.....AGT.G.T.G.A.A.....
MexicoQ153a420a/1-81	G.A.T.....CA.....C.....GTAC.T.G.....AGT.G.T.G.A.A.....
L12P5113/1-79	G.A.T.....CAA.....C.....GTAC.T.G.....AGT.G.T.G.A.T.....
L12P5113b/1-79	G.A.T.....CAA.....C.....GTAC.T.G.....AGT.G.T.G.A.T.....
L12P5113c/1-79	G.A.T.....CAA.....C.....GTAC.T.G.....AGT.G.T.G.A.T.....
L4P4914/1-79	G.A.T.....CAA.....C.....GTAC.T.G.....AGT.G.T.G.A.T.....
L4P4916/1-80	AT.GAT.T.....CAA.....C.....GTAC.T.G.....AGT.G.T.G.A.T.....
L4P4922/1-81	G.A.T.....AG.T.AG.....ACCA.AA.....CA.G.....AT.CT.GGAA.TGT.....T.G.A.C.....
L13P2517/1-79	G.A.T.....AG.T.AG.....ACCA.AA.....CA.G.....AT.CT.GGAA.TGT.....T.G.A.C.....
L13P2517a/1-79	G.A.T.....AG.T.AG.....ACCA.AA.....CA.G.....AT.CT.GGAA.TGT.....T.G.A.C.....
L13P2517b/1-79	G.A.T.....AG.T.AG.....ACCA.AA.....CA.G.....AT.CT.GGAA.TGT.....T.G.A.C.....
Para6013b/1-71	T.TGG.....A.A.CT.C.....GTC.....CA.G.....AC.TGGAA.GT.....T.G.A.C.....
Para6013c/1-71	T.TGG.....A.A.CT.C.....GTC.....CA.G.....AC.TGGAA.GT.....T.G.A.C.....
Para6015/1-71	T.TGG.....A.A.CT.C.....GTC.....CA.G.....AC.TGGAA.GT.....T.G.A.C.....
L1P24-21/1-75	T.T.G.....GAT.AATCC.....G.....T.GGAA.GT.....T.G.A.C.....
L1P24-21/1-75	T.T.G.....GAT.AATCC.....G.....T.GGAA.GT.....T.G.A.C.....
L1P24-215c/1-75	T.T.G.....GAT.AATCC.....G.....T.GGAA.GT.....T.G.A.C.....
L2P37223/1-72	CTGGG.....G.A.TTT.....C.....ACTTGGAA.GT.....T.G.A.C.....
L2P37223b/1-72	CTGGG.....G.A.TTT.....C.....ACTTGGAA.GT.....T.G.A.C.....
L2P37223c/1-72	CTGGG.....G.A.TTT.....C.....ACTTGGAA.GT.....T.G.A.C.....
Para6020/1-70	CTG.G.....G.A.TTTC.....TC.TG.....C.....ACTTGGAA.GT.....T.G.A.C.....
L9P3229/1-75	T.TGG.....A.....ATCCTC.....GA.....GCTTGGAA.GT.....T.G.A.C.....
L9P3229a/1-75	T.TGG.....A.....ATCCTC.....GA.....GCTTGGAA.GT.....T.G.A.C.....
L9P3229b/1-75	T.TGG.....A.....ATCCTC.....GA.....GCTTGGAA.GT.....T.G.A.C.....
L2P3728/1-77	T.TGG.....G.A.CTT.....GA.....GCTTGGAA.GT.....T.G.A.C.....
Para6013/1-77	T.TGG.....G.A.CTT.....GA.....GCTTGGAA.GT.....T.G.A.C.....
L13P2519/1-85	CGAA.....CT.C.....A.....AA.CT.....A.A.....
L13P2519a/1-85	CGAA.....CT.C.....A.....AA.CT.....A.A.....
L13P2519b/1-85	CGAA.....CT.C.....A.....AA.CT.....A.A.....
L12P515/1-79	G.....GTC.....G.G.....CGCT.....TGGAA.TG.....T.....AC.C.....
L4P4920/1-71	AG.G.....GG.....TCCTC.GA.GT.....C.G.....A.CG.....CT.CT.GGAA.TGT.....TGAC.....
Para6019/1-73	TGGG.....GATTACT.GA.GT.....C.G.....A.CG.....CTCTTGGAA.GT.....TT.....ACC.....
Para6021/1-73	TGGG.....GATTACT.GA.GT.....C.G.....A.CG.....CTCTTGGAA.GT.....TT.....ACC.....
Para6028a/1-73	TGGG.....GATTACT.GA.GT.....C.G.....A.CG.....CTCTTGGAA.GT.....TT.....ACC.....
Para6022/1-74	TG.....G.A.....CTTCA.GT.....C.G.....A.CG.....CGT.....TGGAA.TG.....T.....AC.C.....
Para6023/1-74	TG.....G.A.....CTTCA.GT.....C.G.....A.CG.....CGT.....TGGAA.TG.....T.....AC.C.....
Para6025/1-74	TG.....G.A.....CTTCA.GT.....C.G.....A.CG.....CGT.....TGGAA.TG.....T.....AC.C.....
MexicoQ153a423/1-73	T.GGG.....GAATC.T.....A.GT.....C.G.....TT.AG.....CCT.G.A.G.....TG.....A.....
L2P37219/1-76	T.GGG.....GAATC.T.....A.GT.....C.G.....TT.AG.....CCT.G.A.G.....TG.....A.....
L9P126a/1-75	T.GGG.....GAATC.C.....CCT.TT.AG.G.....CT.G.A.G.....TGT.GT.A.....
L9P126b/1-75	T.GGG.....GAATC.C.....CCT.TT.AG.G.....CT.G.A.G.....TGT.GT.A.....
L2P3727/1-75	T.GGG.....GAATCCT.....A.G.....CT.....TGGAA.TG.....T.....AC.C.....
L2P3727b/1-75	T.GGG.....GAATCCT.....A.G.....CT.....TGGAA.TG.....T.....AC.C.....
L2P3727c/1-75	T.GGG.....GAATCCT.....A.G.....CT.....TGGAA.TG.....T.....AC.C.....
L4P4918/1-71	T.GGG.....GAATCTC.....G.....CC.....TTTA.G.....CT.G.A.G.....TGT.GT.A.....
L4P4923/1-75	T.TG.A.....GA.C.....A.CG.....CTCT.GGAA.TGT.....TGAC.....
L1P24-22a/1-83	G.G.A.A.....A.A.....T.T.G.....A.....
L4P4921/1-75	CATTCAACTG.....T.GAA.....A.....A.G.....CTACTTGGAA.GT.....T.....A.A.....
Para69a/1-79	CATTCAACTG.....T.GAA.....A.....A.G.....CTACTTGGAA.GT.....T.....A.A.....
Para601/1-79	CATTCAACTG.....T.GAA.....A.....A.G.....CTACTTGGAA.GT.....T.....A.A.....
L2P3722/1-73	CTG.....G.A.CT.....GA.GT.....C.G.....A.G.....ACTCT.GGAA.TGT.....T.G.A.C.....
L4P4925/1-77	C.AT.CA.CT.....TGGG.....AAA.C.....A.GG.....CGCTACTTGGAA.GT.....T.....A.....
L4P4927/1-74	T.GGG.....GAATC.....A.GG.....CTCT.GGAA.TGT.....T.G.A.C.....
L2P37227/1-74	CTGG.....G.A.GCT.....GA.GT.....C.G.....A.G.....AGC.....TGGAA.TG.....T.....GT.A.....
MexicoQ153a415/1-75	T.GGG.....GAA.C.....A.G.....AGTCT.GGAA.TGT.....T.G.A.C.....
MexicoQ153a415a/1-75	T.GGG.....GAA.C.....A.G.....AGTCT.GGAA.TGT.....T.G.A.C.....
MexicoQ153a425a/1-76	T.TGG.....GAA.G.....A.G.A.CT.....TGGAA.TG.....T.....GT.A.....
MexicoQ153a425a/1-76	T.TGG.....GAA.G.....A.G.A.CT.....TGGAA.TG.....T.....GT.A.....
MexicoQ153a417/1-78	C.AT.CA.CT.....TGGG.....AA.C.....A.G.....CTACTTGGAA.GT.....T.....A.....
L2P37224/1-77	C.AT.CA.C.....T.TGG.....GAA.C.....A.G.....AGCTACTTGGAA.GT.....T.....A.....
L2P3726a/1-78	C.AT.CA.CT.....TGGG.....AA.CC.....A.G.....AGCTACTTGGAA.GT.....T.....A.....
L2P3726/1-77	C.AT.CA.CT.....TGGG.....AA.CC.....A.G.....AGCTACTTGGAA.GT.....T.....A.....
L2P3726b/1-77	C.AT.CA.CT.....TGGG.....AA.CC.....A.G.....AGCTACTTGGAA.GT.....T.....A.....

Consensus

AGGCCATTCAACTGTTTGAAGATTGTGCCCTTGGATGAGGAGGTCGGGGTCACTGTTCCCTTCCCTCCA-TTTCAAAAGAACTACTTGGAAATGTGTGTTCCG+TT

Figura 36- Árvore filogenética inferida para o gene 3'-N-D usando o método Neighbor-Joining (Saitou, Nei,1987). As distâncias evolutivas, foram calculadas usando o método de máxima verossimilhança (Tamura et al., 2004). e estão em unidades do número de substituições de bases por local. As análises foram realizadas com o programa MEGA6.

4.4 Discussão

O número de investigações sobre diversidade genética de *J. curcas* têm aumentado nos anos recentes, a maior parte dos estudos tem usado sistemas de marcadores moleculares dominantes (Ovando-Medina et al., 2011). Contudo, ainda há poucos estudos que descrevam a diversidade alélica e molecular em bancos de germoplasma com base em SNPs. Por esta razão, abordagens de diversidade e evolução molecular são necessárias para revelar as particularidades deste genoma e auxiliar nos programas de melhoramento genético.

O genoma completo de *J. curcas* foi sequenciado usando uma combinação do método tradicional de Sanger e metodologias de sequenciamento de nova geração com uma cobertura de 100 vezes. Ao todo ele apresenta aproximadamente 400 milhões de pares de bases em tamanho e é similar ao genoma do arroz (Sato et al., 2011).

Segundo Carvalho et al. (2008), *J. curcas* é uma espécie diploide e seu genoma é relativamente pequeno 416Mb arranjado em n=11 cromossomos, com conteúdo de GC total de 34,7%. Cerca de 42 mil genes codificadores de proteínas foram diagnosticados além de genes relacionados a transposons (SATO et al., 2011). Possui ainda um banco de dados com cerca de 43,349 entradas de ESTs (Genbank dbEST030012, 1º de março de 2012).

4.4.1 Variação da frequência alélica

Conforme fora apontado na seção anterior os dados revelam a diversidade de alelos para os três genes MFP2, KASIII e 3'-N-D, com 8, 10 e 26 haplótipos identificados respectivamente. Foi revelado também por este estudo variação em termos de proteínas codificadas. Uma explicação plausível para isso seria a existência de parálogos.

Com base nos resultados obtidos e desconsiderando os possíveis erros de sequenciamento, a não existência de parálogos implicaria que um genótipo diploide apresentasse dois alelos. As figuras 26 e 31 ilustram a existência de dois agrupamentos a e b que podem representar que estes genes encontram-se

preferencialmente em heterozigose nestes acessos, apenas L2P37-2 (híbrido f1) apresenta comportamento diferenciado.

4.4.2- Variação em nível de polimorfismo de sequência

Fan et al. (2013) estudando uma subfamília em gramíneas, mostraram que a análise dos níveis de diversidade e os padrões de substituição em loci homoeólogos em poliplóides em comparação com seus parentes diplóides podem fornecer informações sobre a forma como o processo evolutivo é diferente entre linhagens e entre loci homoeólogos dentro das linhagens.

Neste estudo é revelada a diversidade alélica de 3 genes (MFP2, KASIII e 3'-N-D) em 10 genótipos do BAG-IAC. Verifica-se que MFP2 e KASIII apresentam basicamente dois alelos no banco e que os acessos são heterozigotos e com baixa diversidade na região estudada. Enquanto a região estudada de 3'-N-D mostrou-se aparentemente altamente polimórfica. Este estudo é altamente relevante para o quadro do programa de melhoramento genético porque mostra que o grau de diversidade alélica da espécie. Contudo, a região conservada destes genes não se mostrou apropriada para uma associação com as características fenotípicas ou biogeográficas. O uso de diagramas de network poderiam ser uma alternativa para este estudo porém, deveríamos ampliar o número de acessos e o número de clones (n=10) sequenciados por acesso.

As informações dos padrões de agrupamento e das relações filogenéticas apresentadas entre os haplótipos elucidaram a diversidade alélica existente no BAG-IAC, e será importante para atividades de seleção de genótipos elite e orientação de cruzamentos entre acessos com características agronômicas de interesse.

Tanto quanto se sabe, *J. curcas* é uma cultura de grande potencial industrial e se encontra em estágio inicial de domesticação. O acesso à diversidade genética da espécie disponível na forma de coleções de germoplasma é ponto de partida para o sucesso do seu melhoramento.

Os resultados aqui apresentados são inéditos e relevantes para a continuidade dos estudos com a espécie. Nas seções seguintes serão estudados outros aspectos da diversidade, em nível transcricional e metabólico, que juntamente com as informações deste estudo devem ser usadas para a seleção de acessos e/ou populações mais apropriadas para o melhoramento. É importante destacar que

o programa de melhoramento se encontra em fase de seleção de genótipos, onde já foram separados 56 plantas elite e dados desta natureza serão valiosos nos testes de progênie que estão por ser realizados.

Capítulo 2

**DIVERSIDADE NA MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES *MFP2*, *KAS III* E
3'-*N-D* TAXOL EM GENÓTIPOS CONTRASTANTES DE *J. CURCAS* L.**

5.1 Introdução e revisão de literatura

A ampla introdução mundial de *J. curcas* para fins variados tem tido um sucesso limitado devido ao rendimento incerto de sementes e de óleo, com baixo retorno econômico. A principal limitação do material vegetal usado atualmente é a estreita base genética, baixa produtividade e a vulnerabilidade a um grande espectro de estresses bióticos e abióticos (Sujatha, 2013).

A maioria das variedades de *J. curcas* L. são resultados da seleção feita em populações naturais (Heller, 1996; Henning, 2006). Praticamente não há nenhuma informação acerca do número de introduções e da variabilidade genética disponível de populações existentes na maioria dos países.

Por isso mesmo este estudo além de investigar a diversidade de alelos em genes de vias metabólicas de caracteres agrônômicos de interesse, busca neste capítulo compreender o comportamento destes genes (*MFP2*, *KASIII* e *3'-N-D*) em diferentes genótipos e nas condições de campo do BAG-IAC, para auxiliar na seleção de genótipos elite.

5.1.2 Estudos de Expressão em genes de interesse em *J. curcas*

Hoje em dia, já se tem vários estudos de genômica funcional mostrando o padrão de expressão de genes de interesse em *J. curcas*. A exemplo, Gomes et al. (2010) caracterizaram uma biblioteca de cDNA a partir de sementes em três estágios de maturação dos frutos antes do amadurecimento e mediram a diferença em nível de expressão por PCR em tempo real entre folhas e frutos de quatro genes (palmitoilacil-tioesterase proteína transportadora, 3-cetoacil-CoA-tiolase B, aciltransferase ácido lisofosfatídico e geranyl pirofosfato sintase) envolvidos em alguns caracteres economicamente importantes da planta.

Com o uso de tecnologia de sequenciamento aplicado de nova geração “Illumina” Jiang et al. (2012) analisou perfis de expressão gênica global em *J. curcas* usando sementes em desenvolvimento com 14, 19, 25, 29, 35, 41 e 45 dias após a polinização (DAP). Os perfis adquiridos revelaram os quadros de expressão temporal dos genes-chave envolvidos em importantes processos metabólicos incluindo: fluxo de carbono, o metabolismo de amido e síntese de lipídios, metabolismo de proteínas de armazenamento nas sementes em desenvolvimento.

Análises com PCR quantitativo em tempo real também indicaram que o gene *JcKAS III*, um dos alvos deste estudo, foi expresso em todos os tecidos examinados de *J. curcas* (raiz, caule, cotilédone, folha, flor e semente de 29 dias após o florescimento-DAF) (Li et al., 2008).

É sabido que espécies de polinização cruzada tem significativamente maior diversidade genética comparada com espécies autógamas, mas *J. curcas* mesmo sendo predominantemente uma espécie alógama, exibiu baixa variação genética em populações locais muito provavelmente devido a sua propagação vegetativa por estaquia e ou apomixia (Sujatha, 2013).

Portanto, embora a comunidade científica já tenha um conhecimento considerável acerca da expressão de genes de interesse em *J. curcas*, percebe-se que estes estudos não consideraram a procedência e a diversidade genética do material, que conforme já mencionado varia de acordo com o local e com as condições ambientais.

O objetivo do presente estudo é analisar a expressão gênica diferencial entre 12 genótipos contrastantes de *Jatropha* do BAG do IAC para produtividade de óleo, e em diferentes estádios desenvolvimento considerando os diversos tecidos (folhas, flores e sementes de frutos em diferentes estádios).

5.2 Material e métodos

5.2.1 A seleção dos genótipos e o procedimento de coleta

A idéia inicial neste estudo era comparar os genótipos estudados quanto a diversidade alélica no CAP 01. No entanto, com os resultados obtidos pelo grupo de avaliações fitoquímicas realizadas no Instituto de Tecnologia de Alimentos-Campinas (ITAL) foi revelada a existência de genótipos contrastantes para conteúdo de óleo (%) e concentração de ésteres de forbol (mg/g). Por isso, neste estudo foram selecionados 12 indivíduos do banco que apresentam caracteres fenotípicos contrastantes para conteúdo de óleo e concentração de ésteres de forbol. Deste modo, 5 indivíduos com baixa e 4 indivíduos com alta concentração de forbol foram selecionados. Em relação ao conteúdo de óleo foram selecionados 5 indivíduos de alto teor de óleo e 3 indivíduos com baixo teor de óleo (Tabela 5).

Tabela 5: Genótipos contrastantes selecionados para a análise de expressão dos genes (*MFP2*, 3'-N-debenzoyl, Ketoacil-ACP-sintase III). Discriminação das coletas realizadas no ano agrícola de 2012. Os genótipos destacados em rosa foram estudados no capítulo 01 quanto a diversidade molecular.

Fenótipo Bioquímico		Dados fitoquímicos Forbol(mg/g)/Óleo(%)	Coletas				
			Flor	Fruto 1	Fruto 2	Fruto 3	
Alto forbol		L10P41	1,7 (mg/g)	25.10.2012	23.11.2012	28.11.2012	28.11.2012
		L4P17	1,6 (mg/g)	25.10.2012	23.11.2012	28.11.2012	28.11.2012
	Alto Óleo	L4P36	2,0 (mg/g)/31,8%	25.10.2012	23.11.2012	28.11.2012	28.11.2012
	Baixo Óleo	L3P56	1,6 (mg/g)/21,0%	25.10.2012	23.11.2012	28.11.2012	28.11.2012
Baixo Forbol	Alto Óleo	L4P49	0,5 (mg/g)/31,8%	25.10.2012	23.11.2012	28.11.2012	28.11.2012
		L3P50	0,6 (mg/g)	25.10.2012	23.11.2012	28.11.2012	28.11.2012
	Baixo Óleo	L3P24	0,9 (mg/g)/18,5%	25.10.2012	23.11.2012	28.11.2012	28.11.2012
		L3P29	0,8 (mg/g)	25.10.2012	23.11.2012	28.11.2012	28.11.2012
		L2P52	0,7 (mg/g)	25.10.2012	23.11.2012	28.11.2012	28.11.2012
Alto Óleo		L9P32	33,03%	25.10.2012	23.11.2012	28.11.2012	28.11.2012
		L4P23	32%	25.10.2012	23.11.2012	28.11.2012	28.11.2012
		L7P30	33,58%	25.10.2012	23.11.2012	28.11.2012	28.11.2012

As coletas foram realizadas de acordo com o ciclo fenológico da planta (ver seção Revisão de literatura). Foram escolhidos flores e frutos; as folhas foram coletadas para serem usadas como controle experimental. Inflorescências e frutos

foram coletados no ano agrícola “produtivo” 2012-2013 em três estágios de desenvolvimento (Figura 38).

As condições climáticas da fazenda Santa Elisa (IAC) nos dias e local de coleta estão listadas na tabela 6.

Tabela 6- Condições climáticas no Campo (Fazenda Santa Elisa-IAC) nos dias de coleta dos tecidos.

Local: Campinas			
Leitura	Chuva (mm)	Umidade Relativa 7h (%)	Umidade Relativa 13h (%)
25/10/2012	12	100	28
23/11/2012	12	100	25
28/11/2012	10	81	64

As amostras foram identificadas, fotografadas e congeladas em campo com nitrogênio líquido, posteriormente elas foram trituradas em laboratório e armazenadas em ultrafreezer -80 °C para extração de RNAs totais para os ensaios de expressão gênica em tempo-real no laboratório de Biologia Molecular-IAC.

Figura 38- (a) inflorescência de *J. curcas*; (a1) botão floral. (b) Três estágios de desenvolvimento dos frutos após polinização. (b1) estágio 1- fruto com medida entre 5 e 10 mm ou ~15 dias; (b2) estágio 2- fruto com medida entre 10 e 20 mm ou ~19 dias; (b3) estágio 3- fruto com medida entre 20 e 40 mm ou ~23. As medidas dos frutos foram feitas do ápice a base com paquímetro.

5.2.2 Extração de RNA total e síntese de cDNA

Após testes iniciais foi necessária a utilização de dois métodos distintos para melhor desempenho na extração dos RNAs em cada tecido. Para Folhas e inflorescências o método de extração utilizado foi do cloreto de lítio (Sambrook et al., 1989), já para frutos em desenvolvimento a extração foi feita de acordo com as recomendações do kit *Purelink RNA MiniKit* (Ambion).

As amostras foram tratadas com 1 unidade de DNase Turbo (Ambion - Applied Biosystems, Foster City, CA), conforme instruções do fabricante. Em seguida foram resolvidas em gel de agarose 1 % para verificação da integridade e depois quantificadas em NanoDrop. Após o término, as amostras foram armazenadas a -80°C até o momento do uso. Cerca de 1 μg de RNA total foi utilizado para síntese de 1ª fita de cDNA de acordo com as recomendações do kit SuperScript® III Reverse Transcriptase (Life Technologies).

Após síntese de 1ª fita os cDNAs foram quantificados em Epoch BioTek para cálculos de diluição seriada. Os cDNAs de cada estágio e de cada genótipo (5 cDNAs para cada um dos 12 genótipos), foram diluídos inicialmente da sua concentração inicial para 100 ng/ μL em um volume de 50 μL . A partir de então eles foram diluídos para 10 ng/ μL em um volume final de 100 μL . As amostras foram armazenadas à -20°C .

5.2.3 Desenho dos iniciadores

Os iniciadores foram desenhados utilizando o software PRIMER Designer 2.0, atendendo as recomendações para seu uso em PCR em tempo real com amplicons curtos de até no máximo 250 pb. As características de cada iniciador usado neste estudo estão descritas na (Tabela 7). O gene endógeno escolhido para este estudo foi a ubiquitina que apresentou melhor resultado nos ensaios de eficiência com DNA genômico.

Tabela 7- Características dos iniciadores desenhados para cada gene.

Nome do primer	Sequencia F e R	Tamanho do produto (pb)	TM (°C)	TA (°C)
<i>Multifunctional protein MFP2</i>	5'-GGACAATCTCCAAAAGTGGCATA-3' 5'-CGGATCATTGGAGCCCAT-3'	170	75	59
<i>3'-N-debenzoyl-2'-deoxytaxol N-benzoyltransferase</i>	5'-TGAGTGGCTTCACAGATTGG-3' 5'-GGTACAACACTTCCAAGTAG-3'	102	73	47
<i>Ketoacyl-ACP Synthase III</i>	5'-CCAAGTTAGACCAGCTCCAA-3' 5'-GCAGTTGCGACACGATTAGA-3'	174	75	51
<i>Ubiquitin (Endógeno)</i>	5'-AAGATGTTGGAGGTGGTGTC-3' 5'-GGTGTACCACTTCTGTATCC-3'	150	76	50

5.2.4 Amplificação dos loci via PCR convencional

As reações de PCR foram realizadas da seguinte maneira: 10,0 µL 5X GO Taq Buffer (promega); 3,0 µL de MgCl₂ 25 mM (promega); 1,0 µL de dNTPs 10 mM (promega); 1,25 µL de primer F (10 µM); 1,25 µL de primer R (10 µM); 0,25 µL da GoTaq DNA polimerase (5 µ/µL) (promega); 32,25 µL de H₂O Milli-Q e 1,0 µL de DNA molde (400 ng/µL), completando um volume final de 50 µL. As condições das reações foram: 95 °C por 4 min; 30 ciclos de 95 °C por 30s; 50 °C por 30s; 72 °C por 2 min e mais 72 °C por 7 min e 15 °C para finalizar. As reações foram realizadas em termociclador *Applied Biosystems* (Veriti 96-well *Thermal Cycler*) em placas de 96 poços e a temperatura de anelamento foi de 50 °C para todos os primers.

5.2.5 Eficiência da reação de amplificação

A eficiência da reação de amplificação também foi determinada para cada gene analisado. Primeiramente foi montado um pool de cDNA de modo que pelo menos 50% de todos os tecidos fossem representados. Assim o *pool* foi montado a partir de cDNA de 3 indivíduos (L10P41, L4P36, L4P49) dos tecidos flor, fruto 1, fruto 2 e fruto 3. A concentração final do *pool* foi medida em Epoch e a partir dela foi feita a diluição para 100 ng/µL. Todos os testes foram realizados em triplicata utilizando alíquotas do pool de cDNA para uma concentração final em massa de 100 ng (primeiro ponto) seguido de diluições de forma seriada na proporção de 1:2 (total de 5 a 6 pontos).

Após o término da reação foi elaborada uma curva padrão, por meio da qual foi calculada a eficiência (E) e a correlação entre os pontos da curva (R^2). A eficiência da reação (E) indica a capacidade de amplificação dos reagentes utilizados (*primers* e enzima) a cada ciclo. Uma eficiência de 100% indica que a cada ciclo a quantidade de produto em cada reação dobra. De acordo com a literatura, são consideradas satisfatórias reações com eficiência entre 90 a 110%. Os valores de R^2 indicam a reprodutibilidade da pipetagem dos reagentes, sendo satisfatórios valores de R^2 de ao menos 0,90. Os cálculos foram feitos de acordo com a seguinte equação:

$$Efficiency = 10^{(-1/slope)} - 1$$

As reações de PCR foram feitas utilizando 200 nM de cada primer (F e R para cada gene), 10 µL de SYBR Green, 1 µL de cada ponto da curva do cDNApool nas concentrações (100 ng; 50 ng; 25 ng; 12,5 ng; 6,25 ng) e 5 µL de H₂O milli Q (Ambion). As reações foram feitas para um volume final de 20 µL de acordo com as recomendações do kit SYBR Green PCR reaction kit (Life Technologies, USA).

As condições usadas durante a qRT-PCR foram: 55°C for 5 min, 95°C for 10min, 40 ciclos de 95°C por 15s, 60°C por 1min, seguido de um passo de dissociação.

As reações foram feitas em triplicata. Mas devido à insuficiência de material não foi possível realizar o experimento com a triplicata biológica para todos os indivíduos e tecidos.

5.2.6 Reações de PCR em tempo real

As reações de RT-PCR em tempo real foram realizadas em placas de 96 poços (Applied Biosystems) em triplicata para cada indivíduo e tecido. Em cada poço da placa foi adicionado 5 µL do cDNA (50 ng), 4 µL do mix de primer (Forward e Reverse -200 nM de cada), µL de H₂O milli Q (Ambion) e 10 µL de SYBR® Green master mix (Life Technologies, USA).

As condições usadas durante a qRT-PCR foram: 55°C for 5 min, 95°C for 10 min, 40 ciclos de 95°C por 15s, 60°C por 1 min, seguido de um passo de dissociação.

5.2.7 Análise dos dados

Vandesompele et al. (2002) delinearam uma estratégia para identificar os genes de controle, em sua maioria de forma estável, expressos em um determinado conjunto de tecidos, e para determinar um número mínimo de genes necessários para calcular um fator de normalização confiável. Os autores concluíram que a estratégia de normalização apresentada é um pré-requisito para o perfil de expressão gênica de PCR em tempo real, que, entre outras coisas, abre a possibilidade de estudar a relevância biológica das pequenas diferenças de expressão. Neste estudo foi utilizado o gene Ubiquitina de *J. curcas* e o tecido folha como “controle” para os cálculos da expressão relativa.

A análise dos resultados foi feita pelo método de quantificação relativa descrito por (Livak, Schmittgen, 2001) (Applied Biosystems- Life Technologies, USA), que descreve a mudança na expressão do gene alvo em relação a um grupo de referência, como um controle não tratado; no caso deste estudo consideramos as folhas como controle.

Os dados de expressão relativa de todos os tecidos em relação à folha foram analisados estatisticamente com cálculos de médias e desvios-padrão e posteriormente plotados no software “JColor Grid”, um visualizador gráfico escrito em Java (University of California San Francisco and University of California Berkeley, 2005).

5.3 Resultados

5.3.1 Teste de primers por PCR convencional

Inicialmente os *primers* foram testados por PCR convencional, a partir de DNA genômico isolado do genótipo L13P30, (Ver CAP01). Conforme pode ser observado na Figura 39, todos os pares de *primers* renderam amplicons com tamanhos que correspondem ao esperado (o que corrobora com o que foi mostrado na Tabela 7).

Figura 39: Produto de PCR dos primers (*MFP2*, *3'-N-D* e *KASIII*) amplificados com DNA genômico da variedade L13P30 (*J. curcas* L. do BAG-IAC) resolvidos em gel de agarose 1%.

5.3.2 Extração de RNA total

Como pode ser observado nas (Figuras 40, 41, 42, 43 e 44) a extração resultou em RNA total íntegro e apropriado para as reações subsequentes de síntese de cDNA em todos os tecidos. A análise do gel permitiu constatar que as técnicas empregadas resultam na recuperação de RNA de boa qualidade para cada tecido estudado.

Figura 40- RNAs totais extraídos de folhas jovens de genótipos contrastantes para óleo e forbol (*J. curcas* L. do BAG-IAC) resolvidos em gel de agarose 1%.

Figura 41- RNAs totais extraídos de botões florais de genótipos contrastantes para óleo e forbol (*J. curcas* L. do BAG-IAC) resolvidos em gel de agarose 1%.

Figura 42- RNAs totais extraídos de sementes de frutos estágio 1 de genótipos contrastantes para óleo e forbol (*J. curcas* L. do BAG-IAC) resolvidos em gel de agarose 1%.

Figura 43- RNAs totais extraídos de sementes de frutos estágio 2 de genótipos contrastantes para óleo e forbol (*J. curcas* L. do BAG-IAC) resolvidos em gel de agarose 1%.

Figura 44- RNAs totais extraídos de sementes de frutos estágio 3 de genótipos contrastantes para óleo e forbol (*J. curcas* L. do BAG-IAC) resolvidos em gel de agarose 1%.

5.3.3 Teste de eficiência dos pares de primers por PCR em tempo real

A eficiência de amplificação dos pares de *primers* desenhados foi checada por meio por meio de PCR em tempo real utilizando-se o pool de cDNAs.

A curva padrão gerada para cada um dos genes é representada pelo valor CT correspondente versus o log da quantidade de cDNA utilizada na reação. A partir do *slope* desta curva foi possível calcular a eficiência de amplificação (*E*) dos *primers*, por meio da fórmula:

$$E = [10^{(-1/\text{Slope})} - 1] \times 100$$

Para uma quantificação confiável em PCR em tempo real, o valor do *slope* deve estar num intervalo entre - 3,3 a - 3,8, o que corresponde a uma eficiência de amplificação de 83 a 100%. Conforme pode ser observado na Tabela 8 os pares de

primers de todos os genes encontram-se dentro do intervalo, o que validou a sua utilização em experimentos de PCR em tempo real.

Na figura abaixo (Figura 45) estão representadas as curvas de amplificação das amostras diluídas seriadamente (lado esquerdo) e a curva padrão obtida, com os valores de R^2 dos genes *MFP2*, *KASIII*, *3'-N-D* e *Ubiquitina* (endógeno).

Figura 45- Curvas padrão obtidas nos testes de padronização da eficiência das reações de RT-PCR em tempo real para os genes (A) *MFP2*, (B) *KASIII*, (C) *3'-N-D* e (D) *Ubiquitina*. Os gráficos mostram a amplificação do material de acordo com a diluição das amostras (lado esquerdo), a partir da qual foi gerada a curva padrão expressa como a média dos Cts em função da diluição da amostra (direita). Os valores de R^2 podem ser visto em cada gráfico.

Tabela 8- Cálculo da eficiência de amplificação dos pares de *primers* utilizados nas reações de PCR em tempo real.

Primer	Amostra	Slope (-)	R ²	Eficácia	Eficiência (%)
MFP2	cDNA Pool	-3,7	0,99	1,8632	86,32
3-N-D	cDNA Pool	-3,06	0,99	2,1222	112,22
KAS III	cDNA Pool	-3,47	0,99	1,9417	94,17
UBIQUITIN	cDNA Pool	-3,61	0,98	1,8924	89,24

5.3.4 Análises da Expressão Gênica Relativa pelo método $2^{-\Delta\Delta C_T}$

Após os pares de *primers* terem sido testados e a eficiência da amplificação mensurada, procedeu-se à investigação do padrão de expressão relativa dos genes candidatos nas condições testadas por meio de reações de PCR em tempo real.

5.3.4.1 A expressão do gene *MFP2*

Nas condições analisadas, os resultados da expressão relativa em relação ao tecido folha mostraram que para o gene *MFP2* a maioria dos genótipos (L10P41, L4P17 L4P36, L4P49, L3P24, L3P29, L12P52 e L4P23) foram mais expressos em sementes dos frutos no primeiro estágio de desenvolvimento. Apenas os genótipos L13P56, L3P50, L9P32 e L7P30, superexpressaram este gene mais no estágio 2 das sementes do que no estágio 1 (Figura 46). Conforme será discutido na próxima seção, o *MFP2* participa tanto da síntese quanto do catabolismo de ácidos graxos e esta envolvido nos primeiros momentos da formação do embrião o que mostra que estes resultados estão dentro do esperado para este gene.

Figura 46- Cluster de expressão obtido após análise dos valores de expressão relativa do gene *MFP2* em relação ao tecido folha pelo método $2^{-\Delta\Delta C_T}$. A figura mostra os valores da expressão relativa obtida por cada genótipo e em cada tecido. A escala mostra a relação entre as cores e o número de vezes que o gene é superexpresso em relação ao controle. Os valores de desvio padrão estão em anexo.

5.3.4.2 A expressão do gene *KAS III*

Para este gene, os resultados mostraram que na maioria dos genótipos ele é superexpresso em sementes de fruto nos estádios 1 e 2. Nos genótipos L3P50, L3P24, L3P29, L12P52 e L4P23 ele foi mais expresso no estágio 1. Já nos genótipos L4P17, L4P36, L13P56, L4P49, L9P32 e L7P30, ele foi mais superexpresso em sementes de frutos no estágio 2. O genótipo L10P41 foi o único que apresentou maior expressão em flores com um valor alto de expressão relativa em relação a folha como pode ser observado na figura 47.

Figura 47- Cluster de expressão obtido após análise dos valores de expressão relativa do gene *KAS III* em relação ao tecido folha pelo método $2^{-\Delta\Delta C_T}$. A figura mostra os valores da expressão relativa obtida por cada genótipo e em cada tecido. A escala mostra a relação entre as cores e o número de vezes que o gene é superexpresso em relação ao controle. Os valores de desvio padrão estão em anexo.

É interessante ressaltar que os genótipos que tiveram o gene *KAS III* superexpressos no estágio 2 foram os genótipos caracterizados pelo alto teor de óleo nas sementes, a saber: L4P36 (31,8%), L4P49 (31,8%), L9P32 (33,03%), L7P30 (33,58%). A exceção foi o genótipo L4P23 (32%), que superexpressou *KAS III* no estágio 1. Os genótipos que apresentaram superexpressão de *KAS III* no estágio 1 foram os genótipos com baixa concentração de ésteres de forbol, a saber: L3P50 (0,6 mg/g), L3P24 (0,9 mg/g), L3P29 (0,8 mg/g), L12P52 (0,7 mg/g). Isso pode ser um indicativo de que o elevado conteúdo de óleo está ligado à alta concentração de forbol o que não é desejável tendo em vista que o forbol é um componente tóxico e inviabiliza o reaproveitamento da torta da semente. Por outro

lado L4P49 que superexpressa *KASIII* no estágio 2, é um genótipo destaque por apresentar alto conteúdo de óleo e baixa concentração de ésteres de forbol.

5.3.4.3 A Expressão do gene 3'-N-D

Como já fora dito na seção CAP01 deste trabalho, o gene 3'-N-D está envolvido na biossíntese do diterpeno taxol. Os resultados obtidos mostraram um perfil bastante variável na modulação da expressão entre os genótipos e tecidos analisados (Figura 48).

Figura 48- Cluster de expressão obtido após análise dos valores de expressão relativa do gene 3'-N-D em relação ao tecido folha pelo método $2^{-\Delta\Delta C_T}$. A figura mostra os valores da expressão relativa obtida por cada genótipo e em cada tecido. A escala mostra a relação entre as cores e o número de vezes que o gene é superexpresso em relação ao controle. Os valores de desvio padrão estão em anexo.

Entre os genótipos analisados, 5 superexpressaram o 3'-N-D em sementes de frutos do estágio 01, a saber: L10P41 (1,7 mg/g), L4P17(1,6 mg/g) com alta

concentração de forbol, L3P24 (0,9 mg/g), L3P29 (0,8 mg/g) com baixa concentração de forbol, e L4P23 (32%) com elevado teor de óleo.

Os genótipos L13P56 (1,6 mg/g), L4P49 (0,5 mg/g e 31,8 % de óleo), L12P52 (0,7 mg/g), L9P32 (33,03% de óleo) e L7P30 (33,58% de óleo) superexpressaram 3'-*N-D* em sementes do estágio 2. Os genótipos com alta concentração de forbol como L13P56 (1,6 mg/g e 21% de óleo) juntamente com o genótipo L4P36 (2,0 mg/g e 31,8% de óleo) tiveram os picos de expressão de 3'-*N-D* em sementes de frutos no estágio 3.

Outro ponto que foi observado é que nenhum genótipo superexpressou 3'-*N-D* nas flores, mostrando que este gene é mais requisitado ao longo do desenvolvimento das sementes, porém variando os estádios de acordo com o genótipo. Isso pode ser relacionado também com a diversidade de alelos encontrada para o gene na seção Capítulo 01.

5.4 Discussão

Conforme já mencionado na revisão da literatura deste capítulo, vários estudos no âmbito de expressão gênica já foram realizados em *J. curcas*. Todavia, este trabalho revela pela primeira vez a expressão de genes relacionados a biossíntese de óleo e de taxol no âmbito da diversidade de BAG-IAC, onde foi investigada uma amostra de 12 indivíduos fenotipicamente contrastantes e com diferentes procedências do BAG-IAC.

5.4.1 A expressão de *MFP2*

Os resultados mostraram que na maioria dos genótipos (L10P41, L4P17, L4P36, L4P49, L3P24, L3P29, L12P52 e L4P23) *MFP2* foi mais expresso nas sementes dos frutos no primeiro estágio de desenvolvimento. Dentre estes genótipos, L4P49 (31,8%), L4P23 (32,0%), L4P36 (31,8%) são genótipos que apresentam elevado teor de óleo. Como se sabe, o gene *MFP2* está envolvido tanto na síntese quanto no catabolismo de ácidos graxos. Este resultado de superexpressão no estágio 1 sugere muito provavelmente que a atividade de *MFP2* nestes genótipos esteja relacionada com a síntese de ácidos graxos e não com a sua degradação visto que seu acúmulo em *J. curcas* acontece no estágio 3 (Annarao et al., 2008).

Segundo Rylott et al., (2006), o gene *MFP2* está em primeiro lugar envolvido no catabolismo dos ácidos graxos. Seu trabalho mostrou que em *Arabidopsis thaliana* durante a germinação e o crescimento pós-germinativo das sementes oleaginosas os ácidos graxos derivados do armazenamento do triacilglicerol são ativados em acil-CoA e depois convertidos em sacarose pelas vias sequenciais da β -oxidação e ciclo do glioxilato nos peroxissomos e pela via gliconeogênica no citosol. Mas se a atividade enzimática requisitada para esta proteína estivesse relacionada ao catabolismo, muito provavelmente os genótipos apresentariam maior expressão de *MFP2* no estágio 3.

Papéis fisiológicos adicionais para β -oxidação incluem a síntese de sinais derivados de ácidos graxos tais como o ácido jasmônico (Cruz castillo et al., 2004; Pinfield-Wells et al., 2005; Theodoulou et al., 2005; Wasternack, Parthier, 1997),

traumatina (Farmer, 1994) e auxina, porque a β -oxidação converte ácido indol-3-butírico em 3-indol ácido acético (Zolman et al., 2000).

O primeiro relato na literatura de *J. curcas* com relação ao gene MFP2 foi feito por Gomes et al. (2010), contudo ainda não há registros de estudos de expressão gênica de MFP2 para esta espécie. Os genótipos L13P56 (1,6 mg/g) com alta concentração de forbol (tóxica), L3P50 (0,6 mg/g) com baixa concentração de forbol, L9P32 (33,03%) e L7P30 (33,58%) com alto teor de óleo, tiveram pico de expressão para este gene no estágio 2, e isso pode ser um indicativo de que a atividade requisitada pelo MFP2 esteja relacionada com a elongação de ácidos graxos que acontece na mitocôndria (Figuras 9 e 10, CAP01).

Em contra partida, foi mostrado por Richmond and Bleecker (1999) que o gene MFP2 também tem um papel na β -oxidação no contexto do desenvolvimento floral em *A. thaliana*, o que explica a expressão relativa superior a folha em praticamente todos os genótipos.

Por fim cabe salientar que foi alta a variação temporal e tecidual na expressão de MFP2 entre os genótipos e isso pode ser justificado não somente pela interação com o ambiente, mas também pela diversidade alélica encontrada para este gene no BAG (ver CAP01).

5.4.2 A expressão de KAS III

Li et al. (2008) mostraram que a expressão de *JcKAS III* foi significativamente mais alta em raízes do que em outros tecidos. Neste trabalho, análises por PCR em tempo real da expressão do gene *JcKAS III* durante o desenvolvimento da semente (23, 26, 29 e 32 dias após a fertilização) mostraram que a expressão de *JcKAS III* é aumentada à medida em que a semente se desenvolve, o que não corrobora com o que foi encontrado neste estudo que mostra que o ápice da expressão relativa de KASIII se dá no segundo estágio de desenvolvimento das sementes caindo no estágio 3, sobretudo nos genótipos com alto teor de óleo; isso muito provavelmente por conta de que o ápice da biossíntese de ácidos graxos em *J. curcas* se dá neste estágio quando nos estádios seguintes os ácidos graxos começam a ser armazenados.

Outro ponto que se deve salientar neste estudo é o fato de que o padrão de expressão descrito por Li et al., (2008) para o gene *KAS III*, no nosso caso variou de

genótipo a genótipo e mesmo entre os tecidos e não é um perfil linear como pretende mostrar o seu estudo.

Por outro lado, Gu et al. (2012) mostraram que o pico de expressão de KAS III ocorre no estágio 2 com cerca de 28 dias após polinização e não 50 dias após a polinização quando as sementes já estão praticamente maduras, corroborando com os resultados obtidos neste estudo. KAS está envolvida na formação do acetoacetyl-ACP. Todas as espécies de plantas examinadas até agora contêm três isoenzimas KAS (I, II e III) e cada uma distingue-se pela sua especificidade ao substrato (Buchanan, 2000).

A análise dos níveis de acil-ACPs em plantas e bactérias *in vivo* (Jackowski, Rock, 1987; Pós-Beittenmiller et al. 1991; Clough et al. 1992) *apud* (Li et al., 2008) sugerem que KAS III desempenha um papel regulador na biossíntese de ácidos graxos e a alteração dos níveis de expressão desta enzima tem ajudado a definir mais claramente a influência dela sobre regulação da biossíntese de ácidos graxos.

Por exemplo, em folhas de tabaco e *Arabidopsis* e sementes de colza, a superexpressão de KAS III resulta no aumento das concentrações de ácidos graxos (C16:0) (Li et al., 2008). Também foi observado nestes trabalhos que há um decréscimo na quantidade de ácidos graxos (C18:1) e um aumento na quantidade de (C18:2) e (C18:3) quando o gene KAS III foi superexpresso. Isso ajuda a entender porque nos resultados obtidos neste estudo o estágio 2 foi o que teve os genótipos caracterizados pelo alto teor de óleo nas sementes [L4P36 (31,8%), L4P49 (31,8%), L9P32 (33,03%), L7P30 (33,58%)] superexpressando KASIII.

Além disso, na seção CAP01 deste trabalho foi mostrado que KAS III apresenta pelo menos 10 variantes alélicas para esta proteína, o que significa que há uma grande diversidade no BAG do IAC no que diz respeito às formas de proteínas codificadas como também na expressão espaço-temporal de cada uma delas.

5.4.3 A expressão de 3'-N-D

Como se sabe o gene 3'-N-D é responsável pelo passo final de acilação na biossíntese do taxol, convertendo 10-deacetylbaecatina III na presença de acetil-CoA em baecatina III (Walker et al., 2002).

Os resultados mostraram ampla variação no padrão de expressão entre os genótipos e entre os tecidos estudados. Os genótipos L10P41(1,7 mg/g), L4P17(1,6 mg/g) com alta concentração de forbol, L3P24 (0,9 mg/g), L3P29 (0,8 mg/g) com baixa concentração de forbol e L4P23 (32%) com elevado teor de óleo, superexpressaram este gene em sementes de frutos do estágio 01.

A literatura ainda não traz nenhuma informação acerca da expressão deste gene em *J. curcas*. Portanto este trabalho é pioneiro em revelar a modulação da expressão deste gene nesta espécie.

Nos genótipos L13P56, L3P24 e L3P29, o aumento da expressão dos genes estudados parece revelá-los como potenciais marcadores para baixo conteúdo de óleo nos estágios Fruto 1 (L3P24 e L3P29) e Fruto 2 (L13P56) . O aumento da expressão do gene KAS III em flor pode ser um bom marcador para acúmulo de forbol no tecido como observado para L10P41.

Capítulo 3

**DIVERSIDADE METABÓLICA DE ÁCIDOS GRAXOS AO LONGO DO
DESENVOLVIMENTO DO FRUTO *DE J. CURCAS* L.**

6.1 Introdução e revisão de literatura

Como já mencionado na introdução geral deste trabalho nesta era pós genômica tem sido feito esforços crescentes para descrever a relação entre o genoma e o fenótipo em células e organismos. Contudo, tem se tornado claro que a compreensão completa do estado dos genes, mensagens e proteínas num sistema vivo por si só não revela o seu fenótipo (Villas-Bôas et al., 2004).

De acordo com Villas-Bôas et al. (2004), uma análise metabolômica cobre a identificação e quantificação de todos os metabólitos intra e extra-celulares com massa molecular menor do que 1000 Da, usando-se diferentes técnicas analíticas. Do ponto de vista metodológico há basicamente duas estratégias para análise do metaboloma, (i) análise alvo e (ii) perfil metabólico. Análises alvo são análises restritas a análises quantitativas de uma classe de compostos relacionados a vias metabólicas específicas. Estas análises são úteis para estudos de efeitos primários de uma alteração genética por exemplo.

Conforme será visto adiante a literatura já traz estudos da variação da composição entre os ácidos graxos ao longo do desenvolvimento da semente de *J. curcas*, como por exemplo o trabalho de (Jiang et al., 2012), entretanto, ele não faz uma abordagem de diversidade genética pois trabalhou apenas com um único acesso.

Neste trabalho objetivou-se realizar uma análise alvo da composição de ácidos graxos do óleo em diferentes estádios de desenvolvimento da semente por meio da técnica de metabolômica de cromatografia gasosa com detector de ionização por chama (GC-FID) nos diferentes acessos deste estudo e correlacioná-lo com o perfil de expressão gênica e diversidade genética.

6.1.1 O óleo de *J. curcas*

A composição química do óleo de *J. curcas* é bastante simples. O óleo contém basicamente 1.4% de ácido mirístico (C14:0), 10.5–15.6% de palmítico (C16:0), 2.3–9.7% de esteárico (C18:0), 40.8–48.8% de oléico (C18:1), 32.1–44.4% de linoléico (C18:2) e 0.4% de araquídico (C20:0) (Foidl et al., 1996; Naharet et al., 2005; Adebowale, Adedire, 2006; Martínez-Herrera et al. 2006; Kumar, Sharma, 2008; Singh, Singh, 2010; Gomes et al. 2010).

Augustus et al. (2002) relatou que sementes de *J. curcas* contém em torno de 20–40% de óleo. Sua fração de óleo consiste tanto dos ácidos graxos saturados (ácido palmítico 14.1% e ácido esteárico 6.7%) quanto dos insaturados (ácido oléico 47% e ácido linoléico 31.6%). Recentemente, há um relato (Martinez-Herrera et al., 2006) que aponta que o conteúdo encontrado nas amostras de óleo foram dos ácidos oléico (41.5–48.8%), linoléico (34.6–44.4%), palmítico (10.5–13.0%) e esteárico (2.3–2.8%). O Triacilglicerol é predominante entre as espécies de lipídios, destacando-se como principal deles o 1,2-dioleoil-3linoleoil-rac-glicerol. O ácido linoléico foi classificado como ácido graxo predominante no óleo de *J. curcas* (Adebowale, Adedire, 2006).

Na abordagem de Akintayo (2004) verifica-se também que o óleo da *J. curcas* contém 72,7% de ácidos graxos insaturados com predominância do oléico. Os percentuais da composição de ácidos graxos e as características físico-químicas do óleo são mostrados nas Tabelas 1 e 2 respectivamente.

Tabela 9- Percentual (%) da composição de ácidos graxos em sementes de *J. curcas*.

Ácidos Graxos	Percentuais em <i>J. curcas</i> L.
Palmítico	19.5±0.8
Esteárico	6.8±0.6
Oléico	41.3±1.5
Linoléico	31.4±1.2
Linolênico	-
Saturados	26.3
Insaturados	72.7

Fonte: Akintayo (2004)

Outro ponto importante a se considerar é que em *J. curcas* o óleo é armazenado no endosperma, que é um tecido triploide devido a dupla fecundação (Dumas, Rogowski, 2008).

6.2 Material e métodos

6.2.1 Seleção dos genótipos, coleta e quenching do material vegetal

Os genótipos selecionados neste estudo são os mesmos 12 analisados no CAP02 de expressão gênica (ver Tabela 5 cap 02) que já foram caracterizados fenotipicamente para teor de óleo e concentração de forbol. A coleta de frutos para as análises metabólicas de composição do óleo foi realizada conjuntamente com a coleta de material para extração de RNA, ou seja, frutos do mesmo cacho, na mesma época (data) e sob as mesmas condições edafoclimáticas descritas no capítulo 02 desta tese. Frutos de *J. curcas* L. localizados em campo foram coletados em três diferentes estágios de desenvolvimento (Figura 49). A inativação do metabolismo (quenching) foi feita através do congelamento das amostras em nitrogênio líquido ainda no local de coleta, elas foram devidamente identificadas e armazenadas à -80° C para posterior liofilização e extração de óleo.

Figura 49: Estádios de maturação dos Frutos de *J. curcas* coletados para extração de óleo das sementes. (a) estágio 1 - fruto com medida entre 5 e 10 mm ou ~15 dias após polinização; (b) estágio 2 - fruto com medida entre 10 e 20 mm ou ~19 dias após polinização; (c) estágio 3 - fruto com medida entre 20 e 40 mm ou ~23 dias após polinização.

Antes de proceder com a extração de óleo, as sementes foram trituradas a frio em nitrogênio líquido, a amostra de cada um dos 12 genótipos foi normalizada por biomassa, ou seja, elas foram pesadas ainda congeladas, em seguida foram liofilizadas em liofilizador (Liotop) e após liofilização elas foram pesadas novamente.

6.2.2 Extração de óleo via aparato Soxhlet

O método utilizado na extração do óleo das sementes consistiu na extração exaustiva com uso de solvente orgânico, neste caso foi utilizado (n-Hexano) por meio do aparelho soxhlet. Um extrator Soxhlet é um aparato de vidraria de laboratório composto por um balão volumétrico, que fica sobre uma malha com temperatura controlável, uma câmara de vidro e um condensador (Soxhlet, 1879; Jensen, 2007).

As sementes trituradas contendo o óleo desejado foram colocadas no interior de um cone feito de papel de filtro grosso e cobertas com algodão, o qual foi carregado para dentro da câmara principal do extrator de Soxhlet. Após montagem foi colocado 30 mL do solvente n-Hexano num balão de destilação e em seguida o extrator de Soxhlet foi colocado sobre este balão. Por fim, o Soxhlet foi equipado com um condensador e colocado sobre a malha.

O solvente foi aquecido ao refluxo. O vapor de solvente viajou até um braço de destilação onde houve inundações para a câmara que abriga o dedal de sólido. O condensador garantiu que qualquer vapor de solvente se esfriasse e escorresse de volta para a câmara que abrigava o material sólido. O procedimento foi feito durante 8h.

Figura 50- Método de extração via extrator Soxhlet. (a) Estrutura do Soxhlet montada com (a1) malha, (a2) câmara de vidro com a amostra envolvida por papel de filtro e (a3) condensador. (b) Evaporador para separação do óleo e do solvente. (c) Óleo de *J. curcas* sendo evaporado. (d) óleo sendo extraído no Extrator Soxhlet. (e) Óleo após evaporação do solvente.

Após este período o fluxo de água do condensador foi desligado, assim como a malha e a mistura de solvente com óleo foi levada até um banho para evaporação do solvente (Figura 50).

6.2.3 Análise da composição de ácidos graxos por GC-FID

Para a análise dos ácidos graxos. A esterificação foi realizada de acordo com o método de Hartman e Lago (1973), usando solução de cloreto de amônia e ácido sulfúrico em metanol como agente esterificante. A cromatografia gasosa foi realizada em um cromatógrafo a gás, equipado com amostrador automático; injetor split, razão 75:1; coluna capilar CP-SIL 88 (100 m x 0,25 mm d.i, 0,20 mm de filme); detector por ionização em chama (FID) e uma workstation para aquisição dos dados.

As condições de cromatografia foram: temperatura da coluna programada, temperatura inicial 120 °C/2 min, aquecimento de 120 °C a 220 °C numa escala de 2,2 °C/min e de 220 a 235 °C numa escala de 1,5 °C/min, permanecendo em 235 °C por 15 min; gás de arraste, hidrogênio numa vazão de 1 mL/min; gás *make-up*, nitrogênio a 30 mL/min; temperatura do injetor, 270 °C; temperatura do detector, 310 °C; volume de injeção 1 mL.

A identificação dos ácidos graxos foi realizada através da comparação do tempo de retenção dos ácidos graxos das amostras e padrões. A quantificação foi realizada por normalização de área e os resultados foram expressos em g/100g de amostra.

6.2.4 Análise de dados

Os dados aqui gerados foram analisados inicialmente por estatística descritiva e por análise multivariada. A análise de componentes principais (PCA) é sem dúvida o método de análise multivariada mais empregado para metabólitos intracelulares *fingerprinting* de modo geral na quimiometria. O objetivo do PCA é chegar a uma transformação linear que preserve o máximo da variância possível nos dados originais numa baixa dimensionalidade dos dados de saída (Worley, Powers, 2013). Tais análises foram conduzidas no programa “R”.

6.3 Resultados

6.3.1 Ácidos graxos totalizados

Uma das principais características do óleo que o define como matéria-prima adequada para produção de biodiesel é a sua composição em ácidos graxos. Neste estudo primeiramente foi feita a análise de distribuição média dos ácidos graxos totalizados, isto é por categoria, em todos os estádios. Nesta análise foi feita uma média entre todos os 12 genótipos estudados.

Os resultados mostram que nos três estádios a predominância foi de ácidos graxos saturados, seguido dos poliinsaturados, conforme mostrado na Figura 51. O estádio 3 foi o que apresentou mais dos ácidos monoinsaturados e ômega 6. Também houve um número razoável de ácidos graxos não identificados (N.I) nos 3 estádios, o que significa que esta caracterização necessita ser feita posteriormente com uma técnica analítica mais sensível para identificá-los, como a espectrometria de massas, por exemplo.

Figura 51- Ácidos graxos totalizados em 3 estádios de desenvolvimento da semente de *J. curcas* em 12 genótipos contrastantes do BAG-IAC.

No segundo estágio, foi observado que os níveis de ácido palmítico (C:16:0) se mantiveram altos em relação ao estágio anterior (em média 27,74%), excetuando-se para o genótipo L10P41 que teve um decréscimo de 7% no percentual deste ácido. Os níveis de ácido oléico (C18:1 ômega 9) também caíram em média para os genótipos de 12,54 para 10,41%, porém para o genótipo L10P41 os níveis de ácido oleico aumentaram de 6,67 para 15,95. Já para o ácido linoléico (C18:2 ômega 6) houve um aumento em média nos percentuais entre os genótipos, dentre eles o que mais aumentou foi o L10P41. O ácido alfa-linolênico (C18:3 ômega 3) foi bastante variável com aumentos e diminuições percentuais entre os genótipos do estágio 1 para o estágio 2.

Figura 53- Distribuição percentual dos ácidos graxos que ocorrem durante o segundo estágio (estádio 2) de desenvolvimento da semente de *J. curcas* em 12 genótipos contrastantes do BAG-IAC.

No genótipo L3P50 foi observada a síntese do ácido graxo cis-11-eicosenóico (C 20:1 ômega 11) num percentual pequeno (0,81%), mas que não foi detectado no estágio anterior. Os genótipos L4P49 e L12P52 também apresentaram percentuais baixos do ácido heneicosanóico (C 21:0) (Figura 53).

Interessantemente no terceiro estágio apareceram picos de ácido cáprico (C10:0) e undecanóico (C11:0), mas apenas no genótipo L3P24 (Figura 54).

Figura 54- Distribuição do percentual dos ácidos graxos que ocorrem durante o terceiro estágio (estádio 3) de desenvolvimento da semente de *J. curcas* em 12 genótipos contrastantes do BAG-IAC.

O genótipo L7P30, teve um aumento substancial de ácido oleico no estágio 3 em relação ao estágio 2 (de 10,95 para 42,16%). Os genótipos L4P36, L13P56, L4P49, L3P50 e L3P24 tiveram seu percentual de oléico (18:1) aumentado, ao passo que os demais diminuíram. Os ácidos graxos mais abundantes neste estágio

entre os genótipos foram os palmítico (C16:0), esteárico (C18:0), oléico (C18:1), linoléico (C18:2), alfa-linolênico (C18:3) e tricosanóico (C23:0). Todos os genótipos apresentaram elevado percentual de ácido palmítico (C16:0) neste estágio (>25%). Entre os genótipos com elevado teor de óleo nas sementes (destacados em amarelo na Figura 54) L4P49 (31,8%), L9P32 (33,03%), L4P23 (32%), L4P36 (31,8%), os ácidos graxos mais abundantes foram nesta ordem: palmítico (C16:0), linoléico (C18:2) e oléico (18:1), com exceção do genótipo L7P30 (33,58%) que apresentou 42,16% de oléico (18:1), 36,45% de linoléico (C18:2) e 13,9% de palmítico (C16:0).

6.3.3 Análise Multivariada

Para tentar encontrar significado neste conjunto de dados, foi usado um método bastante comum em análises de metabólitos, que envolve a análise multivariada (MVA): a análise de componentes principais (PCA).

O PCA enxerga a variação máxima de todas as variáveis. Esta direção, com variação máxima define a direção do primeiro componente principal, ou seja, a primeira dimensão do novo sistema de coordenadas. O segundo componente principal tem que ser ortogonal (isto é, não correlacionado) ao primeiro e neste sentido a maioria das variações restante tem de ser encontradas.

Seguindo essa abordagem os resultados revelaram a variação máxima no estágio 1. Os dados foram agrupados em 3 grupos distintos, sendo dois na primeira dimensão, isso em função dos genótipos. O ácido palmítico (C16:0) foi o mais variável entre os genótipos, por outro lado a variação foi mínima para (C18:1), (C18:0), e um pouco maior para (C18:2) e (C18:3) (Figura 55).

Figura 55- (A) Pontuações de PCA para variação da composição de ácidos graxos nas sementes do estágio 1 em 12 genótipos de *J. curcas*. (B) Gráfico de variáveis considerando apenas variáveis ativas.

No estágio 2 praticamente foi observado o mesmo perfil. Neste caso os ácidos graxos mais dispersos, ou seja, mais variáveis entre os genótipos foram (C16:0), (C18:1), (C18:2) e (C18:3), em detrimento aqueles próximos ao zero das duas dimensões (Figura 56).

Figura 56- (A) Pontuações de PCA para variação da composição de ácidos graxos nas sementes do estágio 2 em 12 genótipos de *J. curcas*. (B) Gráfico de variáveis considerando apenas variáveis ativas.

O estágio 3 já apresentou um número maior de ácidos graxos variantes entre os 12 genótipos. Notadamente pode ver um grupo de ácidos graxos com pouca variação e mais outros 6 bastante variáveis (C16:0), (C18:0), (C18:1), (C18:2), (C18:3) e (C23:0) (Figura 57). Para os ácidos graxos dimensionados no centro que não apresentaram variação, nota-se que eles não são interessantes para seleção com estes genótipos neste estágio.

Figura 57- (A) Pontuações de PCA para variação da composição de ácidos graxos nas sementes do estágio 3 em 12 genótipos de *J. curcas*. (B) Gráfico de variáveis considerando apenas variáveis ativas.

6.4 Discussão

Sabe-se que o balanço entre ácidos graxos saturados e insaturados interferem na composição físico-química do biodiesel afetando seu PE e sua estabilidade oxidativa (Chakrabarti, Prasad, 2012).

Em geral as sementes maduras costumam ter de C16:0 a C20:0, mas neste estudo foi revelado a presença outros ácidos graxos de cadeia mais curta e mais longas, alguns de número impar e muitos outros não identificados. Talvez possa ser ruído integrado devido a pouca quantidade de amostra conseguida. Uma análise mais refinada é sugerida para ser refeita com estes genótipos e confirmar estes achados.

Em conformidade com o que já foi dito este capítulo tem por objetivo estudar a variação da composição de ácidos graxos entre 12 genótipos e ao longo do desenvolvimento da semente de *J. curcas*.

Jiang et al. (2012) também estudaram a mudança na composição de ácidos graxos ao longo do desenvolvimento da semente de *J. curcas*, contudo em seu trabalho eles utilizaram apenas uma variedade e, condições naturais do sul da China (*J. curcas* GZQX0401). Em seu trabalho foi mostrado a variação em 7 fases distintas do desenvolvimento, i.e. 14, 19, 25, 29, 35, 41, e 45 dias após polinização (DAP). Os três primeiros pontos corroboram com os 3 estádios deste estudo.

Para Jiang et al. (2012) o percentual dos ácidos palmítico (C16:0) e esteárico (C18:0) caem do estágio 1 para o estágio 2 e do estágio 2 para o estágio 3 cerca de 5%, ao passo que oléico (C18:1) e linoléico (C18:2) aumentam do estágio 1 para o 2 e do 2 para o 3, sendo que (C18:1) chega atingir quase 50% no ápice da maturidade. Já o ácido alfa-linolênico (C18:3), sofre um aumento do estágio 1 para o 2 e uma diminuição do estágio 2 para o 3.

Em contra partida, os resultados aqui mostrados revelam que essa configuração de aumento e diminuição de ácidos graxos de uma fase para outra varia de genótipo para genótipo. O que pode ser observado neste trabalho a partir das análises feitas é que os ácidos oléico (C18:1) e esteárico (C18:0) durante os dois primeiros estádios de desenvolvimento, praticamente não variaram entre os indivíduos. Contudo, eles apresentaram uma variação alta no terceiro estágio, o mais próximo da maturidade das sementes.

Isto significa que ao longo do desenvolvimento de sua semente, *J. curcas* mostra uma variação que pode indicar um perfil metabólico (fenotípico) distinto entre os indivíduos no que tange ao acúmulo de ácidos graxos em cada um dos genótipos e isto pode estar associado com a modulação diferencial na expressão de genes das vias de biossíntese de ácidos graxos, bem como com a diversidade alélica (genotípica) encontrada como explicitado no capítulo 01 deste estudo. Em outras palavras a composição final de ácidos graxos em cada um dos genótipos pode estar sendo dada em função de todas estas variações apontadas neste estudo.

Segundo Annarao et al. (2008), o teor de óleo aumenta em duas etapas principais, com uma transição muito clara que ocorre em torno da fase IV, quando o teor de óleo aumenta de 3 a 18%, ao passo que os TAG aumentam de 30 a 90%. O peso fresco atinge o seu máximo (~1000 mg) na fase V, ou seja, a fase 3 do experimento de Gomes et al. (2010), e, em seguida, diminui para ~640 mg durante as fases VI e VII. Estas duas últimas etapas são paralelas ao amadurecimento dos frutos, que é acompanhado por uma mudança de cor de verde para amarelo.

Um ponto muito importante é que o alto teor de ácido oléico é necessário para a produção de biocombustíveis. Linhagens de soja convencionais com teor de ácido oléico de 80%, acompanhados por uma diminuição correspondente em ácido linoleico (C18:2) foram obtidos com base na contribuição de apenas dois genes (FAD2-1A e 1B) FAD2-rastreando alelos mutantes com marcadores polimórficos pelo MAS (Pham et al., 2010).

Em virtude disto, a variação encontrada aqui é bastante interessante do ponto de vista biotecnológico e para o programa de melhoramento genético do IAC, haja vista que os ácidos graxos variantes são interessantes para o balanço e estabilidade oxidativa do biodiesel e por isso sua composição pode ser melhorada via seleção.

Capítulo 4

**DIVERSIDADE FÍSICO-QUÍMICA PELA DETERMINAÇÃO DO PODER
CALORÍFICO DO ÓLEO EM GENÓTIPOS CONTRASTANTES DE *J. CURCAS* L.**

7.1 Introdução e revisão de literatura

As propriedades físico-químicas como conteúdo de ácidos graxos livres, valor de iodo, conteúdo de fósforo, de triglicerídeos, por exemplo, são muito importantes para avaliação de um óleo como matéria-prima para biodiesel e para a definição dos processos de pré-tratamento bem como para a economia do processo inteiro (Chakrabarti, Prasad, 2012).

Segundo Chakrabarti e Prasad (2012), óleos de várias fontes de *J. curcas* já foram caracterizados quanto às suas propriedades físico-químicas. Por exemplo, o óleo de uma variedade indiana de *J. curcas* apresentou 918 kg m^{-3} de densidade à 15°C , ponto de fulgor (combustão) de 176°C , ponto de fluidez de -6°C , resíduo de carbono de 0,3% e valor calorífico de 33 MJkg^{-1} .

Sabe-se que quanto mais ácidos graxos saturados estão presentes no óleo o biodiesel obtido por ele pode ter problemas no ponto de fluidez, ou seja, à temperaturas mais baixas deixaria de fluir (Chakrabarti, Prasad, 2012). Por outro lado se ele tiver muitas insaturações, pode ter baixa estabilidade oxidativa (Chakrabarti, Prasad, 2012).

De acordo com a ASTM (American Society for Testing Materials) o poder calorífico é a quantidade de calor produzida pela queima completa da unidade de massa de um combustível sólido ou líquido em volume constante. Em outras palavras ele indica a quantidade de energia desenvolvida pelo combustível por unidade de massa, quando ele é queimado. No caso de um combustível de motores, a queima significa a combustão no funcionamento do motor.

O poder calorífico do biodiesel é muito próximo do poder calorífico do óleo diesel mineral. A diferença média em favor do óleo diesel do petróleo situa-se na ordem de apenas 5%. Entretanto, com uma combustão mais completa, o biodiesel possui um consumo específico equivalente ao diesel mineral (índice de cetano).

O índice de octano ou octanagem dos combustíveis está para motores do ciclo Otto, da mesma forma que o índice de cetano ou cetanagem está para os motores do ciclo Diesel. Portanto, quanto maior for o índice de cetano de um combustível, melhor será a combustão desse combustível num motor diesel (Agência Nacional do Petróleo - ANP).

As variações encontradas neste estudo entre os genótipos do BAG-IAC foram analisadas também em termos físico-químicos pela determinação do Poder Calorífico do óleo com o intuito também de contribuir com a seleção assistida dentro do programa de melhoramento genético. Com efeito, este capítulo tem por objetivo então, analisar o Poder Calorífico do óleo extraído para 12 genótipos contrastantes do BAG-IAC.

7.2 Material e métodos

7.2.1 Seleção dos genótipos, coleta e armazenamento

Os genótipos selecionados neste estudo são os mesmos 12 analisados nos capítulos 02 e 03 de expressão gênica e diversidade na composição de ácidos graxos (ver tabela 9 capítulos 02 e 03) que já foram caracterizados fenotipicamente para teor de óleo e concentração de forbol. A coleta de frutos para as análises metabólicas de composição do óleo foi sementes no estágio V (Annarao et al., 2008), cujos frutos estão amadurecidos e amarelados (aproximadamente de 41 à 45 dias após polinização, Figura 58a). A coleta foi realizada no dia 01 e 07 de fevereiro de 2013, as condições climáticas são mostradas na Tabela 14.

Tabela 10- Condições edafoclimáticas na fazenda Santa Elisa–IAC (Campinas) nos dias de coleta.

	Chuva (mm)	Umidade Relativa 7h (%)	Umidade Relativa 13h
01.02.2013	0	93	52
07.02.2013	9	96	56

Figura 58: (a) Frutos de *J. curcas* nos estádios IV e V de desenvolvimento. (b) Sementes dos frutos armazenadas em tubos falcon antes da trituração.

7.2.2 Extração do Óleo

O método utilizado na extração do óleo das sementes foi o mesmo empregado na seção anterior, consistiu na extração exaustiva com uso de solvente orgânico, que neste caso também foi utilizado (n-Hexano) por meio do aparelho Soxhlet.

As sementes contendo o óleo foram trituradas a fresco, sem congelar, em seguida foram colocadas no interior de um cone feito de papel de filtro grosso e cobertas com algodão, o qual foi carregado para dentro da câmara principal do extractor de Soxhlet. Também foi colocado 30 mL do solvente n-Hexano num balão de destilação e em seguida o extrator de Soxhlet foi colocado sobre este balão. Por fim, o Soxhlet foi equipado com um condensador e colocado sobre a malha. O processo de extração durou cerca de 8h.

Após evaporação do solvente foram recuperados de 0,5 a 1 mL de óleo por genótipo. Diferentemente da extração de óleo do capítulo anterior, aqui o óleo foi inicialmente colocado em estufa à 85 °C para remover quaisquer resíduos do solvente e depois disto as amostras foram colocadas em tubos eppendorf e congeladas à -20 °C até momentos antes dos ensaios.

7.2.3 Ensaio de determinação do Poder Calorífico Superior em Volume Constante (PCSV)

De acordo com a ASTM (*American Society for Testing Materials*), o Poder Calorífico Superior em Volume Constante (PCSV) é a quantidade de calor produzida pela queima completa da unidade de massa de um combustível sólido ou líquido em volume constante, dentro de uma bomba calorimétrica contendo oxigênio nas seguintes condições: pressão inicial do oxigênio 20 a 40 atm, temperatura final de 20 à 35 °C, produto na forma de cinzas, umidade presente no combustível e água resultante da combustão condensadas (água líquida), SO₂, CO₂ e N₂, gasosos. O valor do PC é dito superior porque se recupera o calor de condensação da água. Os ensaios são feitos no interior de um calorímetro (Figura 59).

Figura 59- (A) O calorímetro. (B) Recipiente calorimétrico. (C) e (F) Amostra de óleo no recipiente interno. (D) Fios de Ferro para ignição. (E) Bomba calorimétrica.

Inicialmente a amostra de óleo (combustível) é pesada (são necessários de 0,8 à 1g com precisão de 1 mg). O cadinho é éssado antes e depois de se colocar o combustível, assim se tem a massa de combustível utilizada pela diferença desses valores. Em seguida o cadinho com o combustível suspenso é colocado dentro da bomba. São cortados exatamente 10 cm de fio de ferro (massa=0,007 g; PC: 1600 cal/g). O fio é passado pela amostra, uma de suas extremidades é ligada a haste que suporta o recipiente e a outra ligada à haste que desce da tampa da bomba. São adicionados 1 mL de água na bomba e em seguida ela é fechada. Ela serve para absorver os gases ácidos liberados na queima do combustível. Posteriormente a válvula de admissão da bomba é ligada ao cilindro de oxigênio sob pressão. A bomba é pressurizada com O_2 até 30 atm, depois disso o cilindro é desconectado da bomba. A bomba é então colocada no recipiente calorimétrico e este no recipiente exterior. Uma massa de água conhecida é adicionada ao recipiente calorimétrico. São feitas as ligações elétricas e o recipiente calorimétrico é coberto com sua tampa plástica. O agitador é ligado e o termômetro mergulhado na água do recipiente calorimétrico.

A partir deste ponto, são aguardados 5 min para que desapareçam as perturbações térmicas. A partir deste ponto são feitas as leituras de temperatura (com precisão de 0,01 °C) de minuto em minuto durante 5 min.

Então é feita a ignição e as temperaturas são lidas aos 45, 60, 75, 90, 105 e 120 segundos após ignição. As leituras continuam sendo de minuto em minuto feitas até a temperatura se tornar constante ou variar levemente de modo linear.

7.2.4 Tratamento de dados

Inicialmente são feitas as curvas de temperatura em função do tempo. Depois é feita a correção de diferença de temperatura cujo método é proposto pela ASTM. E por fim são feitos os cálculos do PCS_v de acordo com as equações abaixo.

$$PCS_v = \frac{C.\Delta T - e}{m}$$

$$e = mFe.PC(Fe)$$

Onde:

C= Capacidade Térmica do Calorímetro (Cal . °C)

e= Calor de Combustão do Fio de ferro (Fe)

7.3 Resultados

7.3.1 Curvas de temperatura para cada genótipo BAG-IAC e PCSv

Após análise dos dados, primeiramente foram construídas as curvas de temperatura em função do tempo; estes resultados indicam qual óleo provocaram maior variação na temperatura no intervalo de tempo analisado, mas não indicam qual é o melhor óleo, pois o poder calorífico depende da massa de óleo utilizada e da capacidade térmica do calorímetro (Figura 60).

Figura 60- Curvas de variação de temperatura em função do tempo nos 12 genótipos de *J. curcas* contrastantes para conteúdo de óleo e ésteres de forbol do BAG-IAC.

O PCSv entre os genótipos foi consideravelmente variável; a média entre todos os genótipos foi de 6429 Kcal/Kg. Alguns genótipos apresentaram poder calorífico alto como L10P41, L4P17 e L3P50 com valores >7000 Kcal/kg (Figura 61).

Figura 61- Poder Calorífico Superior à volume constante (PCSv) nos 12 genótipos de *J. curcas* contrastantes para conteúdo de óleo e ésteres de forbol do BAG-IAC.

O genótipo L13P56 foi o que apresentou poder calorífico mais baixo entre todos analisados. Os genótipos com elevado teor de óleo L4P36 (31,8%), L9P32 (33,03%), L4P23 (32,0%) e L7P30 (33,58%), destacados em vermelho na Figura 60 apresentaram Poder Calorífico elevado acima de >6000 Kcal/Kg, à exceção do genótipo L4P49 (31,8%) que apresentou Poder alorífico de 5832,49 Kcal/Kg.

7.3.2 Comparação do Poder Calorífico do óleo de *J. curcas* com outras fontes de combustíveis

Para se ter uma base da dimensão dos valores de PCSv encontrados neste estudo foi feito um levantamento na literatura dos valores para outras fontes de combustível (Tabela 11).

Tabela 11- Densidade e Poderes Caloríficos Superiores dos principais combustíveis.

	Densidade	Poder Calorífico
Gasolina	0,742	8,325 Kcal/L
Diesel	0,852	9,160 Kcal/L
Álcool Hidratado	0,809	5,380 Kcal/L
GLP	0,556	11,750 Kcal/Kg
Óleo Combustível 1A	1,000	10,130 Kcal/Kg
Óleo Combustível 1B	0,938	10,310 Kcal/Kg
Nafta	0,691	11,360 Kcal/Kg
Gás Natural		9,400 Kcal/m ³

Fonte: <http://www.investidorpetrobras.com.br>

Estes valores foram dimensionados em gráfico de histograma para se estabelecer uma comparação com o valor relatado na literatura para o óleo de *J. curcas* que é de 8502 Kcal/Kg segundo (Banapurmath et al., 2012) com os principais combustíveis (Figura 62).

Figura 62- Comparação dos PCSv entre o óleo de *J. curcas* e os principais combustíveis automotivos. O PCS de *J. curcas* usado na figura foi o encontrado por (Banapurmath et al., 2012).

A comparação permite verificar o elevado potencial calorífico do óleo de *J. curcas* mesmo sem ser transesterificado em biodiesel em relação aos combustíveis derivados de petróleo e ao etanol de cana-de-açúcar por exemplo. Também permite afirmar que os valores encontrados para os genótipos do BAG-IAC são elevados, pois são maiores que do etanol e próximos ao da gasolina.

7.4 Discussão

O óleo de *J. curcas* L. é uma das melhores fonte renováveis para produção de biodiesel devido à sua composição favorável em ácidos graxos e baixo teor de matéria insaponificável. Porém o principal inconveniente deste óleo é o seu conteúdo de ácidos graxos livres (Free Fatty Acids - FFA) (Chakrabarti, Prasad, 2012).

Embora o PCS já tenha sido analisado para esta espécie, até o momento nenhum estudo foi realizado com a determinação do Poder Calorífico do óleo em diferentes acessos de *J. curcas*. Por esta razão este estudo é pioneiro ao revelar a variação da combustão em diferentes genótipos e com procedências distintas.

Os resultados mostraram que os valores de PCSv variaram de genótipo para genótipo. Foi observado que os genótipos pré-caracterizados com alto teor de óleo tiveram valores caloríficos altos, à exceção do genótipo L4P49. Segundo Agarwal e Dahr (2012) o óleo de *J. curcas* exibe estágios de combustão quase idênticos aos do diesel mineral, isso porque tem valores de Poder Calorífico muito semelhante.

É importante salientar que a quantidade de frutos produzidos nos períodos produtivos é variável ano a ano conforme fenologia da planta e por isso não se teve material suficiente para repetição dos ensaios. Foi possível verificar neste estudo o elevado potencial calorífico do óleo de *J. curcas* mesmo sem ser transesterificado em biodiesel em relação aos combustíveis derivados de petróleo e ao etanol e que estudos neste sentido devem considerar a variação genética, molecular e físico-química da espécie.

Deste modo, os resultados das análises revelaram uma alta diversidade físico-química no que diz respeito ao Poder Calorífico das variedades de *Jatropha* contida no BAG-IAC e estes dados são biotecnologicamente informativos e podem ser usados nos cruzamentos para busca de genótipos elite neste programa de melhoramento.

8 CONCLUSÕES GERAIS

- Os genes selecionados para aferir a diversidade genética no BAG-IAC não se mostraram adequados. MFP2 e KASIII mostraram baixa diversidade enquanto 3'-N-D mostrou-se muito polimórfico. Outras abordagens de análise poderiam ser utilizadas.
- O estudo de expressão permitiu a associação do perfil de expressão dos genes MFP2, KAS III e 3,N-D com fenótipo de interesse.
- O aumento da expressão dos 3 genes parece revelar-se como potenciais marcadores para baixo conteúdo de óleo nos estágios Fruto 1 (L3P24 e L3P29) e Fruto 2 (L13P56) .
- O aumento da expressão do gene KAS III em flor pode ser um bom marcador para acúmulo de forbol no tecido como observado para L10P41.
- Este estudo mostra pela primeira vez um perfil de expressão para o gene 3'-N-D envolvido na biossíntese de taxol em plantas.
- A exceção do genótipo L7P30, o alto teor de óleo não aparenta estar ligado com o acúmulo de ácidos graxos desejáveis para produção de biodiesel, visto que os ácidos palmítico (C16:0), linoléico (C18:2) e oléico (18:1) foram os mais abundantes nesta ordem.
- O acúmulo de ácidos graxos é variável ao longo do desenvolvimento da semente de *J. curcas* e entre os genótipos indicando uma provável regulação diferenciada da via metabólica no BAG-IAC.
- Foi encontrado um espectro de variação no Poder Calorífico Superior entre os genótipos estudados.
- Genótipos com elevado teor de óleo apresentam Poder Calorífico alto maior do que 6000 Kcal/Kg.
- Todos os níveis de diversidade encontrados neste estudo servirão para seleção de genótipos e direcionamento dos cruzamentos.

REFERÊNCIAS*

- Abdelgadir HA, Johnson SD, Van Staden J. Approaches to improve seed production of *Jatropha curcas* L. S Afr J Bot. 2008;74:359.
- Abe I, Tanaka H, Abe T, Noguchi H. Enzymatic formation of unnatural cytokinin analogs by adenylate isopentenyltransferase from mulberry. Biochem Biophys. Res. Commun. 2007;355:795-800.
- Achten WMJ, Nielsen LR, Aerts R, Lengkeek AG, Kjær ED, Trabucco A, et al. Towards domestication of *Jatropha curcas*. Biofuels. 2010;1:91-107.
- Adams-Phillips L, Barry C, Giovannoni J. Signal transduction systems regulating fruit ripening. Trends Plant Sci. 2004;9:331-8.
- Adebowale KO, Adedire CO. Chemical composition and insecticidal properties of the underutilized *Jatropha curcas* seed oil. African J Biotechnol. 2006;5:901-6.
- Alexandre C, Moller-Steinbach Y, Schonrock N, Gruissem W, Hennig L. *Arabidopsis* MSI1 is required for negative regulation of the response to drought stress. Mol Plant. 2009;2:675-87.
- Allan G, Williams A, Rabinowicz PD, Chan AP, Ravel J, Keim P. Worldwide genotyping of castor bean germplasm (*Ricinus communis* L.) using AFLPs and SSRs. Genet. Resour. Crop Evol. 2008;55:365-78.
- Alonso JM, Ecker JR. Moving forward in reverse: Genetic technologies to enable genome-wide phenomic screens in *Arabidopsis*. Nat Rev Genet. 2006;7:524-36.
- Annarao S, Sidhu OP, Roy R, Tuli R, Khetrpal CL. Lipid profiling of developing *Jatropha curcas* L. seeds using ¹H NMR spectroscopy. Bioresource Technology. 99(18):9032-5, 2008.
- Ambrosi DG, Galla G, Collani S, Barcaccia G. Cloning and bioinformatic characterization of genes controlling key steps of the fatty acid biosynthesis and lipid breakdown in seeds of *Jatropha curcas* L. Special Abstracts / J. Biotechnol. 2010b;150S:19. doi:10.1016/j.jbiotec.2010.08.061.
- Ambrosi DG, Galla G, Purelli M, Barbi T, Fabbri A, Lucretti S, et al. DNA markers and FCSS analyses shed light on the genetic diversity and reproductive strategy of *Jatropha curcas* L. Diversity. 2010a;2:810-36.
- Ashikari M, Sakakibara H, Lin S, Yamamoto T, Takashi T, Nishimura A, et al. Cytokinin oxidase regulates rice grain production. Science. 2005;309:741-5.
- Ashraf M. Inducing drought tolerance in plants: Recent advances. Biotechnol Adv. 2010;28:169-83.

*De acordo com: International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [updated 2011 Jul 15]. Available from: <http://www.icmje.org>

Ashraf M, Athar HR, Harris PJC, Kwon TR. Some prospective strategies for improving crop salt tolerance. *Adv Agron*. 2008;97:45-110.

Atwell S, Huang YS, Vilhjálmsson BJ, Willems G, Horton M, Li Y, et al. Genome-wide association study of 107 phenotypes in *Arabidopsis thaliana* inbred lines. *Nature*. 2010;465:627-31.

Babu RC, Zhang J, Blum A, Ho THD, Wu R, Nguyen HT. HVA, a LEA gene from barley confers dehydration tolerance in transgenic rice (*Oryza sativa* L.) via cell membrane protection. *Plant Sci*. 2004;166:855-62.

Bahadur B, Goverdhan S. Seed and caruncle characters in *Jatropha* L. In: Pokle DS, Naik VN, editors. *Proceedings of Indian association for angiosperm taxonomy*. AksharMudranalaya: Aurangabad; 1996a. p. 7-10.

Banapurmath NR. Combustion of *Jatropha curcas* Oil, Methyl Esters and Blend with Diesel or Ethanol in a CI Engine. In: N. Carels et al.(eds). *Jatropha, Challenges for a New Energy Crop*: 2012; Volume 1. Farming, Economics and Biofuel, Springer Science.

Barabási AL, Oltvai Z. Network biology: understanding the cell's functional organization. *Nature Rev Genetics*. 2004; 5:101-13.

Barkley NA, Wang ML. Application of TILLING and EcoTILLING as reverse genetic approaches to elucidate the function of genes in plants and animals. *Curr Genomics*. 2008;9:212-26.

Baroux C, Blanvillain R, Betts H, Batoko H, Craft J, Martinez A, et al. Predictable activation of tissuespecific expression from a single gene locus using the pOp/LhG4 transactivation system in *Arabidopsis*. *Plant Biotechnol J*. 2005;3:91-101.

Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 2004;116:281–97.

Bartels D, Sunkar R. Drought and salt tolerance in plants. *Crit Rev Plant Sci*. 2005;24:23–58.

Basha SD, 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*. 2007;156:375-86.

Baurle I, Dean C. The timing of developmental transitions in plants. *Cell*. 2006;125:655-64.

Beló A, Zheng P, Luck S, Shen B, Meyer DJ, Li B, et al. Whole genome scan detects an allelic variant of *fad2* associated with increased oleic acid levels in maize. *Mol Genet Genomics*. 2008;279:1-10.

Berger F. Endosperm: the crossroad of seed development. *Curr Opin Plant Biol.* 2003;6:42–50.

Berry EW. An eocene tropical forest in the Peruvian desert. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1929;15:345-6.

Bhatnagar-Mathur P, Reddy DS, Lavanya M, Yamaguchi-Shinozaki K, Sharma KK. Stress inducible expression of *Arabidopsis thaliana* DREB1A in transgenic peanut (*Arachis hypogaea* L.) increases transpiration efficiency under water-limiting conditions. *Plant Cell Rep.* 2007;26:2071-82.

Bhattacharya A, Datta K, Datta SK. Floral biology, floral resource constraints and pollination limitation in *Jatropha curcas* L. *Pak J Biol Sci.* 2005;8:456-60.

Blumberg PM. Protein kinase C as the receptor for the phorbol ester tumor promoters: Sixth Rhoads Memorial Award Lecture. *Cancer Res.* 1988;48:1-8.

Böhlenius H, Huang T, Charbonnel-Campaa L, Brunner AM, Jansson S, Strauss SH, et al. CO/FT regulatory module controls timing of flowering and seasonal growth cessation in trees. *Science.* 2006;312:1040-3.

Bottley A, Xia GM, Koebner RMD. Homoeologous gene silencing in hexaploid wheat. *Plant J.* 2006;47:897-906.

Bornholdt S. Less is more in modelling large genetic networks. *Science* 2005;310:450-1.

Bourne JK. Biofuels: green dreams. *National Geographic Magazine.* 2007;(October):41–59.

Boutilier K, Offringa R, Sharma VK, Kieft H, Ouellet T, Zhang L, et al. Ectopic expression of BABY BOOM triggers a conversion from vegetative to embryonic growth. *Plant Cell.* 2002;14:1737-49.

Brand L, Horler M, Nuesch E, Vassalli S, Barrell P, Yang W, et al. A versatile and reliable two component system for tissue-specific gene induction in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 2006;141:1194-204.

Brumfield RT, Beerli P, Nickerson DA, Edwards SV. The utility of single nucleotide polymorphisms in inferences of population history *TRENDS in Ecology and Evolution* May 2003; Vol.18 No.5.

Bruner AC, Jung S, Abbott AG, Powell GL. The naturally occurring high oleate oil character in some peanut varieties results from reduced oleoyl-PC desaturase activity from mutation of Aspartate 150 to Asparagine. *Crop Sci.* 2001;41:522-6.

Buchanan BB, Gruissem W, Jones RL. *Physiologists ASoP: Biochemistry & Molecular Biology of Plants.* MD: American Society of Plant Physiologists Rockville; 2000.

Cai Y, Sun D, Wu G, Peng J. ISSR-based genetic diversity of *Jatropha curcas* germplasm in China. *Biomass Bioenergy*. 2010;34:1739-50.

Campbell JW, Cronan JE. Bacterial fatty acid biosynthesis: targets for antibacterial drug Discovery. *Annual reviews microbiology*. 2001; 55:305-32.

Carels N. *Jatropha curcas*: A Review. In: Kader J-C, Delseny M, editors. *Advances in Botanical Research*. The Netherlands. Amsterdam: Elsevier; 2009. p. 39-86.

Carels N. The challenge of bioenergies: an overview. In: dos Santos Bernardes MA, editor. *Biofuel's Engineering Process Technology*. Rijeka: InTech; 2011. p. 23-64.

Carvalho CR, Clarindo WR, Praça MM, Araújo FS, Carels N. Genome size, base composition and karyotype of *Jatropha curcas* L., an important biofuel plant. *Plant Sci*. 2008;174:613–7.

Cato SA, Gardner RC, Kent J, Richardson TE. A rapid PCR-based method for genetically mapping ESTs. *Theor Applied Genetics*. 2001;102:296-306.

Chai G, Bai Z, Wei F, King GJ, Wang C, Shi L, et al. *Brassica* GLABRA2 genes: analysis of function related to seed oil content and development of functional markers. *Theor Appl Genet*. 2010;120:1597-610.

Chakrabarti PP, Prasad, RBN. Biodiesel production from *Jatropha curcas* oil. In: N. Carels et al.(eds). *Jatropha, Challenges for a New Energy Crop*. 2012; Volume 1. Farming, Economics and Biofuel, Springer Science.

Chan AP, Crabtree J, Zhao Q, Lorenzi H, Orvis J, Puiu D, et al. Draft genome sequence of the oilseed species *Ricinus communis*. *Nat Biotechnol*. 2010;28:951-9.

Chapman SC, Hammer GL, Podlich DW, Cooper M. Linking biophysical and genetic models to integrate physiology, molecular biology and plant breeding. In: Kang MS, editor. *Quantitative Genetics, Genomics and Plant Breeding*. New York. Wallingford: CABI Publishing; 2002. p. 167-87.

Charlesworth D, Willis JH. The genetics of inbreeding depression. *Nat Rev Genetics*. 2009;10:783-96.

Chaturvedi CP, Lodhi N, Ansari SA, Tiwari S, Srivastava R, Sawant SV, et al. Mutated TATA-box/TATA binding protein complementation system for regulated transgene expression in tobacco. *Plant J*. 2007;50:917-25.

Chen ZJ. Genetic and epigenetic mechanisms for gene expression and phenotypic variation in plant polyploids. *Annu Rev Plant Biol*. 2007;58:377-406.

Chen ZJ. Molecular mechanisms of polyploidy and hybrid vigor. *Trends Plant Sci*. 2010;15:57-71.

Chen J, Li WX, Xie DX, Peng JR, Ding SW. Viral virulence protein suppresses RNA silencing-mediated defense but upregulates the role of microRNA in host gene expression. *Plant Cell*. 2004;16:1302-13.

Chen Y, Lübberstedt T. Molecular basis of trait correlations. *Trends Plant Sci*. 2010;15:454-61.

Chen M, Wang QY, Cheng XG, Xu ZS, Li LC, Ye XG, et al. GmDREB2, a soybean DREbinding transcription factor, conferred drought and high-salt tolerance in transgenic plants. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007;353:299-305.

Cheng Z, Targolli J, Huang X, Wu R. Wheat LEA genes, PMA80 and PMA1959, enhance dehydration tolerance of transgenic rice (*Oryza sativa* L.). *Mol Breed*. 2002;10:71-82.

Chevalier F, Perazza D, Laporte F, Le Hénanff G, Hornitschek P, Bonneville J-M, et al. GeBP and GeBP-like proteins are noncanonical leucine-zipper transcription factors that regulate cytokinin response in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*. 2008;146:1142-54.

Chow K-S, Wan K-L, Isa MNM, Bahari A, Tan S-H, Harikrishna K, et al. Insights into rubber biosynthesis from transcriptome analysis of *Hevea brasiliensis* latex. *J Exp Bot*. 2007;58:2429-40.

Chuck G, Candela H, Hake S. Big impacts by small RNAs in plant development. *Curr Opin Plant Biol*. 2009;12:81-6.

Collins NC, Tardieu F, Tuberosa R. Quantitative trait loci and crop performance under abiotic stress: where do we stand? *Plant Physiol*. 2008;147:469-86.

Cookson SJ, Van Lijsebettens M, Granier C. Correlation between leaf growth variables suggest intrinsic and early controls of leaf size in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ*. 2005;28:1355-66.

Cooper M, Podlich DW, Micallef KP, Smith OS, Jensen NM, Chapman SC, et al. Complexity, quantitative traits and plant breeding: a role for simulation modelling in the genetic improvement of crops. In: Kang MS, editors. *Quantitative Genetics, Genomics and Plant Breeding*. New York. Wallingford: CABI Publishing; 2002. p. 143-66.

Cooper M, van Eeuwijk FA, Hammer GL, Podlich DW, Messina C. Modeling QTL for complex traits: detection and context for plant breeding. *Curr Opin Plant Biol*. 2009;12:231-40.

Corrado G, Karali M. Inducible gene expression systems and plant biotechnology. *Biotechnol Adv*. 2009;27:733-43.

Costa GGL, Cardoso KC, Del Bem LEV, Lima AC, Cunha MAS, et al. Transcriptome analysis of the oil-rich seed of the bioenergy crop *Jatropha curcas* L. *BMC Genomics*. 2010;11:462.

Creelman RA, Mullet JE. Biosynthesis and action of jasmonates in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 1997;48:355-81.

Czapski J, Saniewski M. Stimulation of ethylene production and ethylene-forming enzyme in fruits of the non-ripening nor and rin tomato mutants by methyl jasmonate. *J Plant Physiol.* 1992;139:265-8.

Dalal M, Tayal D, Chinnusamy V, Bansala KC. Abiotic stress and ABA-inducible group 4 LEA from *Brassica napus* plays a key role in salt and drought tolerance. *J Biotechnol.* 2009;139:137-45.

Datta MM, Mukherjee P, Ghosh B, Jha TB. *In vitro* clonal propagation of biodiesel plant (*Jatropha curcas* L.). *Curr Sci.* 2007;93:1438-42.

Day RC, Herridge RP, Ambrose BA, Macknight RC. Transcriptome analysis of proliferating *Arabidopsis* endosperm reveals biological implications for the control of syncytial division, cytokinin signaling, and gene expression regulation. *Plant Physiol.* 2008;148:1964-84.

Dehgan B., Webster G. L. Morphology and infrageneric relationship in the genus *Jatropha* L. (Euphorbiaceae) University Publ. Bot 74:1-75+33 plates, 1979.

Dharmasiri N, Dharmasiri S, Weijers D, Lechner E, Yamada M, Hobbie L, et al. Plant development is regulated by a family of auxin receptor F box proteins. *Dev Cell.* 2005;9:109-19.

Diaz-Hernandez BG. Diversidade genética e desenvolvimento de protocolo de regeneração in vitro em *Jatropha curcas*. Campinas, SP, 2014. Dissertação (Mestrado) - Instituto Agrônomo de Campinas. Programa de Pós-graduação em Agricultura Tropical e Subtropical, Área de Concentração em Genética, Melhoramento Vegetal e Biotecnologia; 2014.

Dierking EC, Bilyeu KD. New sources of soybean seed meal and oil composition traits identified through TILLING. *BMC Plant Biol.* 2009;9:89.

Divakara BN, Upadhyaya HD, Wani SP, Gowda CLL. Biology and genetic improvement of *Jatropha curcas* L.: a review. *Applied Energy.* 2010; 87:732-742.

Doebley JF, Gaut BS, Smith BD. The molecular genetics of crop domestication. *Cell.* 2006;127:1309-21.

Domergue M, Pirot R. *Jatropha curcas* L. Rapport de synthèse bibliographique. CIRAD. Montpellier; 2008. 118 p.

Dumas C, Rogowsky P. Fertilization and early seed formation. *Comptes Rendus Biologies.* 2008; 331:10: 715-725.

Dyson T. Population and food: Global trends and future prospects. London. Routledge; 1996. 231 p.

Endo T, Shimada T, Fujii H, Kobayashi Y, Araki T, Omura M. Ectopic expression of an FT homolog from *Citrus* confers an early flowering phenotype on trifoliate orange (*Poncirus trifoliata* L. Raf.). Transgenic Res. 2005;14:703-12.

Eswaran N, Parameswaran S, Sathram B, Anantharaman B, Kumar GRK, Tangirala SJ. Yeast functional screen to identify genetic determinants capable of conferring abiotic stress tolerance in *Jatropha curcas*. BMC Biotech. 2010;10:23.

Fan X, Sha L-N, Liwang X, Zhang H-Q, Kang H-Y, Wang Y, Zhou Y-H. Phylogeny and molecular evolution of the Acc1 gene within the StH genome species in Triticeae (Poaceae). Gene 529. 2013; p.57–64.

Ferrari RA, Casarini MB, Marques DA, Siqueira WJ. Evaluation of the chemical composition and toxic constituent in physic nut plants from different localities. Braz J Food Technol. 2009;12:309-14.

Finkelstein R, Gampala S, Rock C. Absciscic acid signaling in seeds and seedlings. Plant Cell. 2002;14:15-45.

Firestone, D, editor. Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists Society, 5th ed. rev. Champaign: AOCS; 2007. met. Ce 1e - 91, Ce 1f - 96, Ce1-62. Current through Revision 1, 2008.

Fischer S, Lerman L. DNA fragments differing by single base-pair substitutions are separated in denaturing gradient gels: Correspondence with melting theory. Proc Natl Acad Sci USA. 1983;80:1579-83.

Foidl N, Foidl G, Sanchez M, Mittelbach M, Hackel S. *Jatropha curcas* L. as a source for the production of biofuel in Nicaragua. Bioresour Technol. 1996;58:77-82.

Fujita Y, Fujita M, Satoh R, Maruyama K, Parvez MM, Seki M, et al. AREB1 is a transcription activator of novel ABRE dependent ABA signaling that enhances drought stress tolerance in *Arabidopsis*. Plant Cell. 2005;17:3470-88.

Fujiwara S, Oda A, Yoshida R, Niinuma K, Miyata K, Tomozoe Y, et al. Circadian clock proteins LHY and CCA1 regulate SVP protein accumulation to control flowering in *Arabidopsis*. Plant Cell. 2008;20:2960–71.

Furner IJ, Matzke M. Methylation and demethylation of the Arabidopsis genome. Curr Opin Plant Biol. 2010;14:1-5.

Ganesh Ram S, Parthiban KT, Senthil KR, Thiruvengadam V, Paramathma M. Genetic diversity among *Jatropha* species as revealed by RAPD markers. Genet Resour and Crop Evol. 2008; v. 55, p. 803–809.

Gehring M, Bubb KL, Henikoff S. Extensive demethylation of repetitive elements during seed development underlies gene imprinting. Science. 2009;324:1447-51.

Ginwal HS, Rawat OS, Srivastava RL. Seed source variation in growth performance and oil yield of *Jatropha curcas* Linn in central India. *Silve Senetica*. 2004;53:186-92.

Goel G, Makkar HPS, Francis G, Becker K. Phorbol Esters: structure, biological activity, and toxicity in Animals. *Int J Toxicol*. 2007;26:279-88.

Gohil RH, Pandya JB. Genetic diversity assessment in physic nut (*Jatropha curcas* L.). *Int. J. Plant Prod*. 2008; v. 2, n. 4, p. 321-326.

Gomes, KA. Identificação de genes envolvidos na biossíntese de ácidos graxos e desenvolvimento de marcadores microssatélites no pinhão-mansão (*Jatropha curcas* L.) visando o melhoramento genético para a produção de biodiesel. Ilhéus, BA, 2009. xiii, 88f Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Santa Cruz. Programa de Pós-graduação em genética e Biologia Molecular; 2009.

Gomes KA, Almeida TC, Gesteira AS, Lôbo IP, Guimarães ACR, de Miranda AB, et al. ESTs from seeds to assist the selective breeding of *Jatropha curcas* L. for oil and active compounds. *Genomics Insights*. 2010;3:29-56.

Gosal SS, Wani SH, Kang MS. Biotechnology and drought tolerance. *J Crop Improvement*. 2009;23:19-54.

Greene EA, Codomo CA, Taylor NE, Henikoff JG, Till BJ, Reynolds SH, et al. Spectrum of chemically induced mutations from a large-scale reversegenetic screen in *Arabidopsis*. *Genetics*. 2003;164:731-40.

Greenup A, Peacock WJ, Dennis ES, Trevaskis B. The molecular biology of seasonal flowering responses in *Arabidopsis* and the cereals. *Ann Bot*. 2009;103:1165-72.

Gressel J. Transgenics are imperative for biofuel crops. *Plant Sci*. 2008;174:246-63.

Gu K,Yi C, Tian D, Sangha JS, Hong Y, Yin Z. Expression of fatty acid and lipid biosynthetic genes in developing endosperm of *Jatropha curcas*. *Biotechnology for Biofuels*. 2012; 5:47.

Ha M, Lu J, Tian L, Ramachandran V, Kasschau KD, Chapman EJ, et al. Small RNAs serve as a genetic buffer against genomic shock in *Arabidopsis* interspecific hybrids and allopolyploids. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009;106:17835-40.

Han L, Lobo S, Reynolds, KA. Characterization of b-Ketoacyl-Acyl Carrier Protein Synthase III from *Streptomyces glaucescens* and Its Role in Initiation of Fatty Acid Biosynthesis. *Journal of bacteriology*. Sept. 1998; p. 4481–4486.

Hammer GL, Chapman S, van Oosterom E, Podlich DW. Trait physiology and crop modelling as a framework to link phenotypic complexity to underlying genetic systems. *Aust J Agric Res*. 2005;56:947-60.

Hammer GL, Van Oosterom E, McLean G, Chapman SC, Broad I, Harland P, et al. Adapting APSIM to model the physiology and genetics of complex adaptive traits in field crops. *J Exp Bot*. 2010;61:2185-202.

Hartl DL, Clark AG. Princípios de genética de populações. 4. ed. Porto Alegre: Artmed; 2010. 660 p.

Hartman L, Lago RCA. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. Lab. Pract. 1973; v.22 n8, P.475-481.

He P, Osaki M, Takebe M, Shinano T, Wasaki J. Endogenous hormones and expression of senescence-related genes in different senescent types of maize. J Exp Bot. 2005;56:1117-28.

Heck G, Perry S, Nichols K, Fernandez D. AGL15, a MADS domain protein expressed in developing embryos. Plant Cell. 1995;7:1271-82.

Heller J. Physic nut—*Jatropha curcas* L. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy. 1996. 66 p.

Herrmann D, Barre Ph, Santoni S, Julier B. Association of a CONSTANS-LIKE gene to flowering and height in autotetraploid alfalfa. Theor Appl Genet. 2010;121:865-76.

Hongyo T, Buzard G, Calvert R, Weghorst CM. Cold SSCP: a simple, rapid and nonradioactive method for optimized single-strand conformation polymorphism analyses. Nucl Acids Res. 1993;21:3637-42.

Hu X, Sullivan-Gilbert M, Gupta M, Thompson SA. Mapping of the loci controlling oleic and linolenic acid contents and development of fad2 and fad3 allele-specific markers in canola (*Brassica napus* L.). Theor Appl Genet. 2006;113:497-507.

Ingelbrecht I, van Houdt H, van Montagu M, Depicker A. Posttranscriptional silencing of reporter transgenes in tobacco correlates with DNA methylation. Proc Natl Acad Sci USA. 1994;91:10502-6.

Ingram J, Bartels D. The molecular basis of dehydration tolerance in plants. Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol. 1996;47:377-403.

Jackson SD. Plant responses to photoperiod. New Phytol. 2009;181:517-31.

Jang IC, Oh SJ, Seo JS, Choi WB, Song SI, Kim CH, et al. Expression of a bifunctional fusion of the *Escherichia coli* genes for trehalose-6-phosphate synthase and trehalose-6-phosphate phosphatase in transgenic rice plants increases trehalose accumulation and abiotic stress tolerance without stunting growth. Plant Physiol. 2003;131:516-24.

Jassbi AR, Gase K, Hettenhausen C, Schmidt A, Baldwin IT. Silencing geranylgeranyl diphosphate synthase in *Nicotiana attenuata* dramatically impairs resistance to tobacco hornworm. Plant Physiol. 2008;46:974-86.

Jensen WB. "The Origin of the Soxhlet Extractor". *Journal of Chemical Education* (ACS). 2007; 84 (12): pp. 1913–1914.

Jiang H, Wu P, Zhang S, Song C, Chen Y, Li M, Jia Y, Fang X, Chen F, Wu G. Global Analysis of Gene Expression Profiles in Developing Physic Nut (*Jatropha curcas* L.) Seeds. Plos One. 2012; Volume 7, Issue 5, e36522.

Jha TB, Mukherjee P, Datta MM. Somatic embryogenesis in *Jatropha curcas* Linn., an important biofuel plant. Plant Biotechnol Rep. 2007;1:135–40.

Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Bartel B. MicroRNAs and their regulatory roles in plants. Annu Rev Plant Biol. 2006;57:19–53.

Jongschaap, REE. A systems approach to identify desired crop traits for breeding of *Jatropha curcas*. Em: IFAD International Consultation on Pro-poor *Jatropha* Development. 2008. Disponível em <<http://www.ifad.org/events/jatropha/>>. Acesso em: 24 maio 2012.

Jongschaap REE, Corré WJ, Bindraba PS, Barnderbung WA. Claims and Facts on *Jatropha curcas* L. Global *Jatropha curcas* evaluation breeding and propagation Programme. Plant Research International B. V. Wageningen, Holanda. Reporte v. 158, 42 p., 2007.

Jordi W, Schapendonk A, Davelaar E, Stoop GM, Pot CS, De Visser R, et al. Increased cytokinin levels in transgenic P-SAG12-IPT tobacco plants have large direct and indirect effects on leaf senescence, photosynthesis and N partitioning. Plant Cell Environ. 2000;23:279-89.

Joshi M, Mishra A, Jha B. Efficient genetic transformation of *Jatropha curcas* L. by microprojectile bombardment using embryo axes. Ind Crops Prod. 2011;33:67-77.

Jubera MA, Janagoudar BS, Biradar DP, Ravikumar RL, Koti RV, Patil SJ. Genetic diversity analysis of elite *Jatropha curcas* (L.) genotypes using randomly amplified polymorphic DNA markers. Karnataka J Agric Sci. 2009;22:293-5.

Juhász ACP, Pimenta S, Soares BO, Morais DLB, Rabello HO. Floral biology and artificial polinization in physic nut in the north of Minas Gerais state, Brazil. Pesq Agropec Bras. 2009;44:1073-7.

Julier B, Huguet T, Chardon F, Ayadi R, Pierre JB, Prosperi JM, et al. Identification of quantitative trait loci influencing aerial morphogenesis in the model legume *Medicago truncatula*. Theor Appl Genet. 2007;114:1391-406.

Jullien PE, Berger F. Gamete-specific epigenetic mechanisms shape genomic imprinting. Curr Opin Plant Biol. 2009;12:637-42.

Jung S, Powell G, Moore K, Abbott A. The high oleate trait in the cultivated peanut [*Arachis hypogaea* L.]. II. Molecular basis and genetics of the trait. Mol Gen Genet. 2000;263:806-11.

Jung Ch, Müller AE. Flowering time control and applications in plant breeding. Trends Plant Sci. 2009;14:563-73.

Kalimuthu K, Paulsamy S, Senthilkumar R, Sathya M. *In vitro* propagation of the biodiesel plant *Jatropha curcas* L. Plant Tiss Cult Biotechnol. 2007;17:137-47.

Kao C-H, Multiple-interval mapping for quantitative trait loci controlling endosperm traits. Genetics 2004;167:1987-2002.

Karanam KR, Bhavanasi J. *Jatropha curcas* hybrid Nandan-3 responsible for high oleic content and construction of molecular marker specific to it. US patente WO 2009/072143 A2 1-18. 2009.

Karl SA, Avise JC. PCR-based assays of Mendelian polymorphisms from anonymous single-copy nuclear DNA: techniques and applications for population genetics. Mol Biol Evol.1993; 10. 342–361.

Karanam KR, Bhavanasi J. *Jatropha* interspecific hybrid. US patent US 2010/0287820 A1 1-6. 2010.

Kauffman SA. The origins of order: Self-organization and selection in evolution. New York: Oxford University Press; 1993. 709 p.

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 Bioenergy. 2007;31:497-502.

Kaushik N, Roy S, Biswas GC. Screening of Indian germplasm of *Jatropha curcas* for selection of high oil yielding plants. Ind J Agroforestry. 2006;8:54-7.

Keating BA, Carberry PS, Hammer GL, Probert ME, Robertson MJ, Holzworth D, et al. An overview of APSIM, a model designed for farming systems simulation. Eur J Agron. 2003;18:267-88.

Khemkladngoen N, Cartagena J, Shibagaki N, Fukui K. Adventitious shoot regeneration from juvenile cotyledons of a biodiesel producing plant, *Jatropha curcas* L. J Biosci Bioeng. 2011;111:67-70.

Kim HJ, Ryu H, Hong SH, Woo HR, Lim PO, Lee IC, et al. Cytokinin-mediated control of leaf longevity byAHK3through phosphorylation ofARR2 in Arabidopsis. Proc Nat Acad Sci USA. 2006;103:814-9.

Kimura M. Evolutionary rate at the molecular level. Nature, v. 217, p. 624-626, 1968.

Kimura M, Ohta T. The average number of generations until fixation of a mutant gene in a finite population. Genetics, v. 61, p. 763-771, 1969.

Kindl H. β -oxidation of fatty acids by specific organelles. In The Biochemistry of plants, vol 9 (Stumpf, P.K., ed.). New York: Academic press, pp. 31–50, 1987.

Kirst M, Myburg AA, De Leon JP, Kirst ME, Scott J, Sederoff R. Coordinated genetic regulation of growth and lignin revealed by quantitative trait locus analysis of cDNA microarray data in an interspecific backcross of *Eucalyptus*. *Plant Physiol.* 2004;135:2368-78.

Kleiner K. Civil aviation faces green challenge. *Nature.* 448:120-1, 2007.

Knowles PF, Hill AB. Inheritance of fatty acid content in the seed oil of a safflower introduction from Iran. *Crop Sci.* 1964;4:406-9.

Kochhar S, Singh SP, Kochhar VK. Effect of auxins and associated biochemical changes during clonal propagation of the biofuel plant – *Jatropha curcas*. *Biomass Bioenergy.* 2008;32:1136-43.

Krishnan PR, Paramathma M. Potentials and *Jatropha* species wealth of India. *Curr Sci.* 2009;97:1000-4.

Kristensen TN, Pedersen KS, Vermeulen CJ, Loeschcke V. Research on inbreeding in the 'omic' era. *Trends Ecol Evol.* 2009;25:44-52.

Kumar GR, Sakthivel K, Sundaram RM, Neeraja CN, Balachandran SM, Shobha Rani N, et al. Allele mining in crops: Prospects and potentials. *Biotechnol Adv.* 2010;28:451-61.

Kumar N, Reddy MP. Plant regeneration through the direct induction of shoot buds from petiole explants of *Jatropha curcas*: a biofuel plant. *Ann Appl Biol.* 2010;156:367-75.

Kumar A, Sharma S. An evaluation of multipurpose oil seed crop for industrial uses (*Jatropha curcas* L.): A review. *Ind Crops Prod.* 2008;28:1-10.

Kumar N, Vijay Anand KG, Sudheer PDVN, Sarkar T, Reddy MP, Radhakrishnan T, et al. Stable genetic transformation of *Jatropha curcas* via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene transfer using leaf explants. *Ind Crops Prod.* 2010b;32:41-7.

Kumar N, Vijay Anand KG; Reddy MP. Shoot regeneration from cotyledonary leaf explants of *Jatropha curcas*: a biodiesel plant. *Acta Physiol Plant.* 2010a;32:917–24.

Kumar N, Vijay Anand KG, Reddy MP. *In vitro* regeneration from petiole explants of non-toxic *Jatropha curcas*. *Ind Crops Prod.* 2011;33:146-51.

Kunkeaw S, Tangphatsornruang S, Smith DR, Triwitayakorn K. Genetic linkage map of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) based on AFLP and SSR markers. *Plant Breed.* 2010;129:112-5.

Kurakawa T, Ueda N, Maekawa M, Kobayashi K, Kojima M, Nagato Y, et al. Direct control of shoot meristem activity by a cytokinin-activating enzyme. *Nature.* 2007;445:652-5.

Latha R, Rubia L, Bennett J, Swaminathan MS. Allele mining for stress tolerance genes in *Oryza* species and related germplasm. *Mol Biotech*. 2004;27:101-8.

Laux T, Mayer K, Berger J, Jurgens G. The *WUSCHEL* gene is required for shoot and floral meristem integrity in *Arabidopsis*. *Development*. 1996;122:87-96.

Laviola BG, Rosado TB, Bhering LL, Kobayashi AK, de Resende MDV. Genetic parameters and variability in physic nut accessions during early developmental stages. *Pesq Agropec Bras*. 2010;45:1117-23.

Lespinasse D, Rodier-Goud M, Grivet L, Leconte A, Legnate H, Seguin M. A saturated genetic linkage map of rubber tree (*Hevea* spp.) based on RFLP, AFLP, microsatellite, and isozyme markers. *Theor Appl Genet*. 2000;100:127-38.

Lewis RS, Linger LR, Wolff MF, Wernsman EA. The negative influence of N-mediated TMV resistance on yield in tobacco: linkage drag versus pleiotropy. *Theor Appl Genet*. 2007;115:169-78.

Li D, Liu C, Shen L, Wu Y, Chen H, Robertson M, et al. A repressor complex governs the integration of flowering signals in *Arabidopsis*. *Dev Cell*. 2008b;15:110–20.

Li J, Li MR, Wu PZ, Tian CE, Jiang HW, et al. Molecular cloning and expression analysis of a gene encoding a putative b-ketoacyl-acyl carrier protein (ACP) synthase III (KAS III) from *Jatropha curcas*. *Tree Physiol* 28: 921–927, 2008.

Li M, Li H, Jiang H, Pan X, Wu G. Establishment of an *Agrobacterium*-mediated cotyledon disc transformation method for *Jatropha curcas*. *Plant Cell Tiss Organ Cult*. 2008a;92:173-81.

Librado P, Rozas J. DNASP V5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25. 1451-1452, 2009.

Lifschitz E, Eviatar T, Rozman A, Shalit A, Goldshmidt A, Amsellem Z, et al. The tomato FT ortholog triggers systemic signals that regulate growth and flowering and substitute for diverse environmental stimuli. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006;103:6398-403.

Lin J, Jin YJ, Zhou X, Wang JY. Molecular cloning and functional analysis of the gene encoding geranylgeranyl diphosphate synthase from *J. curcas*. *Afr J Biotechnol*. 2010;9:3342-51.

Lin J, Yan F, Tang L, Chen F. Antitumor effects of curcin from seeds of *Jatropha curcas*. *Acta Pharmacol Sin*. 2003;24:241-6.

Lindroth A, Shultis D, Jasencakova Z, Fuchs J, Johnson L, Schubert D, et al. Dual histone H3 methylation marks at lysines 9 and 27 required for interaction with *CHROMOMETHYLASE3*. *EMBO J*. 2004;23:4146-55.

Liu Q, Chen Y-Q. Insights into the mechanism of plant development: Interactions of miRNAs pathway with phytohormone response. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009;384:1-5.

Liu Q, Chen Y-Q. A new mechanism in plant engineering: The potential roles of microRNAs in molecular breeding for crop improvement. *Biotechnol Adv.* 2010;28:301–7.

Liu B, Vega JM, Segal G, Abbo S, Rodova M, Feldman M. Rapid genomic changes in newly synthesized amphiploids of *Triticum* and *Aegilops*. I. Changes in low-copy noncoding DNA sequences. *Genome*, 1998;41:272-7.

Liu B, Xu C, Zhao N, Qi B, Kimatu JN, Pang J, et al. Rapid genomic changes in polyploid wheat and related species: implications for genome evolution and genetic improvement. *J Genet Genomics.* 2009a;36:519-28.

Liu Q, Zhang YC, Wang CY, Luo YC, Huang QJ, Chen SY, et al. Expression analysis of phytohormone-regulated microRNAs in rice, implying their regulation roles in plant hormone signaling. *FEBS Lett.* 2009b;583:723-8.

Liu Z, Zhu Y, Gao J, Yu F, Dong A, Shen WH. Molecular and reverse genetic characterization of NUCLEOSOME ASSEMBLY PROTEIN1 (NAP1) genes unravels their function in transcription and nucleotide excision repair in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 2009c;59:27-38.

Liu X, Hua X, Guo J, Qi D, Wang L, Liu Z, et al. Enhanced tolerance to drought stress in transgenic tobacco plants overexpressing. *Biotechnol. Lett.* 2008;30:1275-80.

Liu Q, Singh S, Green A. High-oleic and high-stearic cottonseed oils: nutritionally improved cooking oils developed using gene silencing. *J Am Coll Nutr.* 2002;21:205S-11S.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Method. *Methods* 25, 402–408, 2001.

Lokko Y, Anderson JV, Rudd S, Raji A, Horvath D, Mikel MA, et al. Characterization of an 18,166 EST dataset for cassava (*Manihot esculenta* Crantz) enriched for drought-responsive genes. *Plant Cell Rep.* 2007;26:1605-18.

Lopez C, Piégu B, Cooke R, Delseny M, Tohme J, Verdier V. Using cDNA and genomic sequences as tools to develop SNP strategies in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Theor Appl Genet.* 2005;110:425-31.

Loureiro J, Rodriguez E, Dolezel J, Santos C. Comparison of four nuclear isolation buffers for plant DNA flow cytometry. *Ann Bot.* 2006;98:679-89.

Luo C-W, Li K, Chen Y, Sun YY. Floral display and breeding system of *Jatropha curcas* L. *Forestry Stud China.* 2007;9:114-9.

Luo Y, Liu YB, Dong YX, Gao XQ, Zhang YS. Expression of a putative alfalfa helicase increases tolerance to abiotic stress in *Arabidopsis* by enhancing the capacities for ROS scavenging and osmotic adjustment. *J Plant Physiol.* 2009;166:385-94.

Lange BM, Ghassemian M. Genome organization in *Arabidopsis thaliana*: a survey for genes involved in isoprenoid and chlorophyll metabolism. *Journal Plant Mol Biol* 51:925-48, 2003.

Ma Q-H. Genetic engineering of cytokinins and their application to agriculture. *Crit Rev Biotechnol.* 2008;28:213-32.

Ma CX, Casella G, Wu R. Functional mapping of quantitative trait loci underlying the character process: a theoretical framework. *Genetics* 2002;161:1751-62.

Maenhout S, De Baets B, Haesaert G. Graph-based data selection for the construction of genomic prediction models. *Genetics.* 2010;185:1463-75.

Makarevich G, Villar CB, Erilova A, Kohler C. Mechanism of *PHERES1* imprinting in *Arabidopsis*. *J Cell Sci.* 2008;121:906–12.

Makkar HPS, Becker K, Sporer F, Wink M. Studies on nutritive potential and toxic constituents of different provenances of *Jatropha curcas*. *J Agric Food Chem.* 1997;45:3152-7.

Makkar HPS, Kumar V, Oyeleye OO, Akinleye AO, Angulo-Escalante MA, Becker K. *Jatropha platyphylla*, a new non-toxic *Jatropha* species: Physical properties and chemical constituents including toxic and antinutritional factors of seeds. *Food Chem.* 2011;125:63-71.

Mallory AC, Bartel DP, Bartel B. MicroRNA-directed regulation of *Arabidopsis* auxin response factor17 is essential for proper development and modulates expression of early auxin response genes. *Plant Cell.* 2005;17:1360-75.

Malosetti M, van der Linden CG, Vosman B, van Eeuwijk FA. A mixed model approach to association mapping using pedigree information with an illustration to resistance for *Phytophthora infestans* in potato. *Genetics.* 2007;175:879-89.

Malosetti M, Visser RGF, Celis-Gamboa C, van Eeuwijk FA. QTL methodology for response curves on the basis of non-linear mixed models, with an illustration to senescence in potato. *Theor Appl Genet.* 2006;113:288-300.

Marques DA, Franco MC, Siqueira, WJ. Organogênese *in vitro* a partir de segmentos de hipocótilo em pinhão-mansão (*Jatropha curcas* L.). In: Congresso Brasileiro de Plantas Oleaginosas, Óleos, Gorduras e Biodiesel, 5, Varginha, Minas Gerais, 2008.

Martinez-Garcia JF, Virgos-Soler A, Prat S. Control of photoperiod-regulated tuberization in potato by the *Arabidopsis* flowering-time gene *CONSTANS*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002;99:15211-6.

Martínez-Herrera J, Siddhuraju P, Francis G, Dávila-Ortíz G, Becker K. Chemical composition, toxic/antimetabolic constituents, and effects of different treatments on their levels, in four provenances of *Jatropha curcas* L. from Mexico. *Food Chem.* 2006;96:80–9.

Matzke M, Aufsatz W, Kanno T, Daxinger L, Papp I, Mette MF, et al. Genetic analysis of RNA-mediated transcriptional gene silencing. *Biochim Biophys. Acta* 2004;1677:129-41.

Matzke MA, Matzke AJ. Planting the seeds of a new paradigm. *PLoS Biol.* 2004;2:582-6.

McKersie BD, Bowley SR, Harjanto E, Leprince O. Water-deficit tolerance and field performance of transgenic alfalfa overexpressing superoxide dismutase. *Plant Physiol.* 1996;111:1177-81.

Meinke D. A homoeotic mutant of *Arabidopsis thaliana* with leafy cotyledons. *Science.* 1992;258:1647-50.

Michaels SD, Amasino RM. *FLOWERING LOCUS C* encodes a novel MADS domain protein that acts as a repressor of flowering. *Plant Cell.* 1999;11:949-56.

Misra M, Misra AN. *Jatropha*: the biodiesel plant biology, tissue culture and genetic transformation – a review. *Int J Pure Appl Sci Technol.* 2010;1:11-24.

Mishra DK. Selection of candidate plus phenotypes of *Jatropha curcas* L. using method of paired comparisons. *Biomass Bioenergy.* 2009;33:542-5.

Montoya T, Nomura T, Yokota T, Farrar K, Harrison K, Jones JGD, et al. Patterns of Dwarf expression and brassinosteroid accumulation in tomato reveal the importance of brassinosteroid synthesis during fruit development. *Plant J.* 2005;42:262-9.

Ohlrogge JB, Jaworski JG. Regulation of fattyacid synthesis. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* 1997; 48:109-136.

Okogbenin E, Marin J, Fregene M. An SSR-based molecular genetic map of cassava. *Euphytica* 2006;147:433-40.

Okogbenin E, Marin J, Fregene M. QTL analysis for early yield in a pseudo F2 population of cassava. *Afric J Biotechnol.* 2008;7:131-8.

Openshaw K. A review of *Jatropha curcas*: an oil plant of unfulfilled promise. *Biomass Bioenergy.* 2000;19:1-15.

Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1989;86:2766-70.

Pamidimarri DVNS, Mastan SG, Rahman H, Reddy, MP. Molecular characterization and genetic diversity analysis of *Jatropha curcas* L. in India using RAPD and AFLP analysis. *Molecular Biology Reports*. 2010; v. 37, p. 2249–57.

Pecina-Quintero V, Anaya LJL, Zamarripa A, Montes N, Nuñez CA, Solis, J.L.; Aguilar-Rangel, M.R.; Gill, H.R.; Mejía, D.J. Molecular characterization of *Jatropha curcas* L. genetic resources from Chiapas, México through AFLP markers. *Biomass and Bioenergy*. 2011; v. 35, p. 1897–905.

Pan J, Fu Q, Xu Z-F. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of biofuel plant *Jatropha curcas* using kanamycin selection. *Afric J Biotechnol*. 2010; 9:6477-81.

Pan B-Z, Xu Z-F. Benzyladenine treatment significantly increases the seed yield of the biofuel plant *Jatropha curcas*. *J Plant Growth Regul*. 2010;30:166-74.

Park BJ, Liu Z, Kanno A, Kameya T. Increased tolerance to salt and water deficit stress in transgenic lettuce (*Lactuca sativa* L.) by constitutive expression of LEA. *Plant Growth Regul*. 2005a;45:165-71.

Park BJ, Liu Z, Kanno A, Kameya T. Genetic improvement of Chinese cabbage for salt and drought tolerance by constitutive expression of a *B. napus* LEA gene. *Plant Sci*. 2005b;169:553-8.

Park Y-D, Papp I, Moscone EA, Iglesias VA, Vaucheret H, Matzke AJM, et al. Gene silencing mediated by promoter homology occurs at the level of transcription and results in meiotically heritable alterations in methylation and gene activity. *Plant J*. 1996;9:183-94.

Parthiban KT, Kumar RS, Thiyagarajan P, Subbulakshmi V, Vennila S, Rao MG. Hybrid progenies in *Jatropha* – a new development. *Curr Sci*. 2009;96:815-23.

Pastori GM, Foyer CH. Common components, networks and pathways of cross tolerance to stress. The central role of “redox” and abscisic acid-mediated controls. *Plant Physiol*. 2002;129:460-8.

Patel M, Jung S, Moore K, Powell G, Ainsworth C, Abbott A. High-oleate peanut mutants result from a MITE insertion into the FAD2 gene. *Theor Appl Genet*. 2004;108:1492-502.

Pauwels L, Barbero GF, Geerinck J, Tilleman S, Grunewald W, Pérez AC, et al. NINJA connects the co-repressor TOPLESS to jasmonate signaling. *Nature*. 2010;464:788-93.

Peng J, Richards DE, Hartley NM, Murphy GP, Devos KM, Flintham JE, et al. ‘Green revolution’ genes encode mutant gibberellin response modulators. *Nature*. 1999;400:256-61.

Pereira-Netto AB. Genes involved in brassinosteroids’s metabolism and signal transduction pathways. *Braz Arch Biol Techn*. 2007;50:605-18.

Perl A, Perl-Treves R, Galili S, Aviv D, Shalgi E, Malkin S, et al. Enhanced oxidative-stress defense in transgenic potato overexpressing tomato Cu, Zn superoxide dismutase. *Theor Appl Genet*. 1993;85:568-76.

Pham A-T, Lee J-D, Shannon JG, Bilyeu KD. Mutant alleles of *FAD2-1A* and *FAD2-1B* combine to produce soybeans with the high oleic acid seed oil trait. *BMC Plant Biol*. 2010;10:195.

Podlich DW, Winkler CR, Cooper M. Mapping as you go: an effective approach for marker-assisted selection of complex traits. *Crop Sci*. 2004;44:1560-71.

Pogány M, Koehl J, Heiser I, Elstner EF, Barna B. Juvenility of tobacco induced by cytokinin gene introduction decreases susceptibility to Tobacco necrosis virus and confers tolerance to oxidative stress. *Physiol Mol Plant Pathol*. 2004;65:39-47.

Popluechai S, Breviario D, Mulpuri M, Makkar HPS, Raorane M, Reddy AR, et al. Narrow genetic and apparent phenetic diversity in *Jatropha curcas*: initial success with generating low phorbol ester interspecific hybrids. 2009; hdl:10101/npre.2009.2782.1

Primmer CR, et al. Single-nucleotide polymorphism characterization in species with limited available sequence information: high nucleotide diversity revealed in the avian genome. *Mol. Ecol*. 2002; 11, 603–612.

Raju AJS, Ezradanam V. Pollination ecology and fruiting behavior in a monoecious species, *Jatropha curcas* L. (*Euphorbiaceae*). *Curr Sci India*. 2002;83:1395-8.

Ranade SA, Srivastava AP, Rana TS, Srivastava J, Tuli R. Easy assessment of diversity in *Jatropha curcas* L. plants using two single-primer amplification reaction (SPAR) methods. *Biomass Bioenergy*. 2008;32:533-40.

Rao SSR, Vardhini BV, Sujatha E, Anuradha S. Brassinosteroids - A new class of phytohormones. *Curr Sci*. 2002; 82:1239-45.

Ratha KP, Paramathma M. Potentials *and Jatropha species wealth of India*. *Current Sci* 97:1000-1004, 2009.

Reddy KRK, Swamy NR, Bahadur B. Cross incompatibility between *Ricinus* and *Jatropha*. *Plant Cell Incomp Newslett USA*. 1987;17:60-5.

Reyes JL, Chua NH. ABA induction of miR159 controls transcript levels of two MYB factors during *Arabidopsis* seed germination. *Plant J*. 2007;49:592-606.

Rivero RM, Kojima M, Gepstein A, Sakakibara H, Mittler R, Gepstein S, et al. Delayed leaf senescence induces extreme drought tolerance in a flowering plant. *Proc Nat Acad Sci USA*. 2007;104:19631-6.

Romero C, Belles JM, Vaya JL, Serrano R, Culianez-Macia FA. Expression of the yeast trehalose-6-phosphate synthase gene in transgenic tobacco plants: pleiotropic phenotypes include drought tolerance. *Planta*. 1997;201:293-7.

Rosado TB, Laviola BG, Faria DA, Pappas MR, Bhering LL, Quirino B, et al. Molecular markers reveal limited genetic diversity in a large germplasm collection of the biofuel crop *Jatropha curcas* L. in Brazil. *Crop Sci*. 2010;50:2372-82.

Ross JJ, O'Neill DP, Smith JJ, Kerckhoffs LH, Elliott RC. Evidence that auxin promotes gibberellin A1 biosynthesis in pea. *Plant J*. 2000;21:547-52.

Rothengatter W. Climate change and the contribution of transport: Basic facts and the role of aviation. *Transportation Research Part D*. 2010;15:5–13.

Rylott EL, Eastmond PJ, Gilday AD, Slocombe SP, Larson TR, Baker A, Graham IA. The *Arabidopsis thaliana* multifunctional protein gene (MFP2) of peroxisomal β -oxidation is essential for seedling establishment. *The Plant Journal*. 2006; 45, 930–941.

Sadubthummarak U, Parkpian P, Ruchirawat M, Kongchum M, Delaune RD. J. Potential treatments to reduce phorbol esters levels in jatropha seed cake for improving the value added product. *Environ Sci Health B*. 2013; 48(11):974-82.

Sakakibara H, Takei K, Hirose N. Interactions between nitrogen and cytokinin in the regulation of metabolism and development. *Trends Plant Sci*. 2006;11:440-8.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd ed Cold Spring Harbor, N.Y. 1989; Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Saitou N., Nei M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*. 1987; 4:406-425.

Sato M, Sato K, Nishikawa S, Hirata A, Kato J, Nakano A. The yeast RER2 gene, identified by endoplasmic reticulum protein localization mutations, encodes cis-prenyltransferase, a key enzyme in dolichol synthesis. *Mol Cell Biol*. 1999.19:471-83.

Sato S, Hirakawa H, Isobe S, et al. Sequence Analysis of the Genome of an Oil-Bearing Tree, *Jatropha curcas* L. *DNA Research*. 2011; 18, 65–76.

Sato S, Nomura CT, Abe H, Doi Y, Tsuge T. Poly[(R)-3-hydroxybutyrate] formation in *Escherichia coli* from glucose through an enoyl-CoA hydratase-mediated pathway. *J Biosci Bioeng*. 2007; 103:38-44.

Shweta G, Mani S, Mishria GP, Naikp K, Chauhan RS, Tiwari SK, et al. Analogy of ISSR and RAPD markers for comparative analyses of genetic diversity among different *Jatropha curcas* genotypes. *Afr. Journal Biotechnology*. 2008; 7:4230-4243.

Sujatha, M. *Genetic Diversity, Molecular Markers and Marker Assisted Breeding in Jatropha*. In: *Jatropha, Challenges for a New Energy Crop: Volume 2: Genetic*

Improvement and Biotechnology. 2013; DOI 10.1007/978-1-4614-4915-7_20, Springer Science.

Sun QB, Li LF, Li Y, Wu GJ, Ge XJ. SSR and AFLP markers reveal low genetic diversity in the biofuel plant: *Jatropha curcas* in China. *Crop Science*. 2008; v.48, p. 1865-1871.

Saranga Y, Menz M, Jiang CX, Wright RJ, Yakir D, Paterson AH. Genomic dissection of genotype x environment interactions conferring adaptation of cotton to arid conditions. *Genome Res*. 2001;11:1988-95.

Sato S, Hirakawa H, Isobe S, Fukai E, Watanabe A, Kato M, et al. Sequence analysis of the genome of an oil-bearing tree, *Jatropha curcas* L. *DNA Res*. 2010;1-12. doi:10.1093/dnares/dsq030.

Sartunino MH, et al. Produção de oleaginosas para biodiesel. Informe Agropecuário. 2005; v. 26, n. 229, p. 44-78.

Schmidt E, Guzzo F, Toonen M, De Vries S. Aleucinerich repeat containing receptor-like kinase marks somatic plant cells competent to form embryos. *Development*. 1997;124:2049-62.

Schmidt A, Wächtler B, Temp U, Krekling T, Séguin A, Gershenzon J. A bifunctional geranyl and geranylgeranyl diphosphate synthase is involved in terpene oleoresin formation in *Picea abies*. *Plant Physiol*. 2010;152:639-55.

Scott RJ, Spielman M. Epigenetics: Imprinting in plants and mammals - the same but different? *Curr Biol*. 2004;14:R201–3.

Searle I, He Y, Turck F, Vincent C, Fornara F, Kröber S, et al. The transcription factor FLC confers a flowering response to vernalization by repressing meristem competence and systemic signaling in *Arabidopsis*. *Genes Dev*. 2006;20:898-912.

Seki M, Narusaka M, Ishida J, Nanjo T, Fujita M, Oono Y, et al. Monitoring the expression profiles of 7000 *Arabidopsis* genes under drought, cold, and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray. *Plant J*. 2002;31:279-92.

Serrano G, Herrera-Palau R, Romero JM, Serrano A, Coupland G, Valverde F. *Chlamydomonas* CONSTANS and the evolution of plant photoperiodic signaling. *Curr Biol*. 2009;19:359-68.

Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways. *Curr Opin Plant Biol*. 2000;3:217-23.

Shukla VK, Doyon Y, Miller JC, DeKolver RC, Moehle EA, Worden SE, et al. Precise genome modification in the crop species *Zea mays* using zinc-finger nucleases. *Nature*. 2009;459:437-41.

Simon R, Igeno MI, Coupland G. Activation of floral meristem identity genes in *Arabidopsis*. *Nature* 1996;384:59-62.

Singh A, Reddy MP, Chikara J, Singh S. A simple regeneration protocol from stem explants of *Jatropha curcas* - a biodiesel plant. *Ind Crops Prod*. 2010;31:209-13.

Singh SP, Singh D. Biodiesel production through the use of different sources and characterization of oils and their esters as the substitute of diesel: A review. *Renew Sust Energ Rev*. 2010;14:200-16.

Sivamani E, Bahieldin A, Wraith JM. Improved biomass productivity and water use efficiency under water deficit conditions in transgenic wheat constitutively expressing the barley HVA1 gene. *Plant Sci*. 2000;155:1-9.

Soomro R, Memon RA. Establishment of callus and suspension culture in *Jatropha curcas*. *Pak. J Bot*. 2007;39:2431-41.

Stam M. Paramutation: a heritable change in gene expression by allelic interactions in trans. *Mol Plant*. 2009;2:578-88.

Staswick PE. JAZing up jasmonate signaling. *Trends Plant Sci*. 2007;13:66-71.

Stoutjesdijk PA, Hurlestone C, Singh SP, Green AG. High-oleic acid Australian *Brassica napus* and *B. juncea* varieties produced by cosuppression of endogenous Delta12 desaturases. *Biochem Soc Trans*. 2000;28:938-40.

Súarez MC, Bernal A, Gutiérrez J, Tohme J, Fregene M. Developing expressed sequence tags (ESTs) from polymorphic transcript-derived fragments (TDFs) in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Genome*. 2000;43:62-7.

Sudheer PDVN, Balaji C, Reddy MP. Genetic diversity and phylogenetic analysis of genus *Jatropha* based on nrDNA ITS sequence. *Mol Biol Rep*. 2009a. doi: 10.1007/s11033-008-9401-6.

Sudheer PDVN, Mastan SG, Rahman H, Prakash ChR, Singh S, Reddy MP. Cross species amplification ability of novel microsatellites isolated from *Jatropha curcas* and genetic relationship with sister taxa. Cross species amplification and genetic relationship of *Jatropha* using novel microsatellites. *Mol Biol Rep*. 2010b. doi: 10.1007/s11033-010-0241-9.

Sudheer PDVN, Mastan PSG, Rahman H, Reddy MP. Molecular characterization and genetic diversity analysis of *Jatropha curcas* L. in India using RAPD and AFLP analysis. *Mol Biol Rep*. 2010a;37:2249-57.

Sudheer PDVN, Rahman H, Mastan PSG, Reddy MP. Isolation of novel microsatellites using FIASCO by dual probe enrichment from *Jatropha curcas* L. and study on genetic equilibrium and diversity of Indian population revealed by isolated microsatellites. *Mol Biol Rep*. 2010c;37:3785-93.

Sudheer PDVN, Singh S, Mastan SG, Patel J, Reddy MP. Molecular characterization and identification of markers for toxic and non-toxic varieties of *Jatropha curcas* L. using RAPD, AFLP and SSR markers. *Mol Biol Rep*. 2009b;36:1357-64.

Sujatha M, Reddy TP, Mahasi MJ. Role of biotechnological interventions in the improvement of castor (*Ricinus communis* L.) and *Jatropha curcas* L. *Biotechnol Adv*. 2008;26:424-35.

Sun QB, Li LF, Yong L, Wu GJ, Ge XJ. SSR and AFLP markers reveal low genetic diversity in the biofuel plant *Jatropha curcas* in China. *Crop Sci*. 2008;48:1865-70.

Sunil N, Varaprasad KS, Sivaraj N, Kumar TS, Abraham B, Prasad RBN. Assessing *Jatropha curcas* L. germplasm in situ - A case study. *Biomass Bioenergy* 2008;32:198-202.

Sunil N, Sujatha M, Kumar V, Vanaja M, Basha SD, Varaprasad KS. Correlating the phenotypic and molecular diversity in *Jatropha curcas* L. *Biomass Bioenergy*. 2010. doi:10.1016/j.biombioe.2010.11.030.

Sunkar R, Kapoor A, Zhu JK. Posttranscriptional induction of two cu/zn superoxide dismutase genes in *Arabidopsis* is mediated by downregulation of miR398 and important for oxidative stress tolerance. *Plant Cell*. 2006;18:2051-65.

Sunkar R, Zhu JK. Novel and stress-regulated microRNAs and other small RNAs from *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 2004;16:2001-19.

Tang H, Sezen U, Paterson AH. Domestication and plant genomes. *Curr Opin Plant Biol*. 2010;13:160-6.

Tatikonda L, Wani SP, Kannan S, Beerelli N, Sreedevi TK, Hoisington DA, et al. AFLP-based molecular characterization of an elite germplasm collection of *Jatropha curcas* L., a biofuel plant. *Plant Sci*. 2009;176:505-13.

Taiz L, Zeiger E. *Fisiologia Vegetal*. 3a edição, Porto Alegre. Editora Artmed. 2004; 719p.

Thiemann A, Fu J, Schrag TA, Melchinger AE, Frisch M, Scholten S. Correlation between parental transcriptome and field data for the characterization of heterosis in *Zea mays* L. *Theor Appl Genet*. 2010;120:401-13.

Tamura K, Nei M, Kumar S. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*. 2004; 101:11030-11035.

Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*. 2013; 30. 2725-2729.

Tatikonda L, Wani S, Kannan S, Beerelli N, Sreedevi T, Hoisington D. AFLP-based molecular characterization of an elite germplasm collection of *Jatropha curcas* L, a biofuel plant. *Plant Science*. 2009; v. 176, n. 4, p. 505-513.

Townsend JA, Wright DA, Winfrey RJ, Fu F, Maeder ML, Joung JK, et al. High-frequency modification of plant genes using engineered zinc-finger nucleases. *Nature*. 2009;459:442-5.

Turck F, Fornara F, Coupland G. Regulation and identity of florigen: FLOWERING LOCUS T moves center stage. *Annu Rev Plant Biol*. 2008;59:573–94.

Walker K, Long R, Croteau R. The final acylation step in Taxol biosynthesis: Cloning of the taxoid C13-side-chain N-benzoyltransferase from *Taxus*. *PNAS*. 2002; vol. 99, no. 14 , p. 9166-9171. July 9.

Wang G, Dixon RA. Heterodimeric geranyl(geranyl)diphosphate synthase from hop (*Humulus lupulus*) and the evolution of monoterpene biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009;106:9914–9.

Wang YJ, Hao YJ, Zhang ZG, Chen T, Zhang JS, Chen SY. Isolation of trehalose-6-phosphate phosphatase gene from tobacco and its functional analysis in yeast cells. *J Plant Physiol*. 2005;162:215-23.

Wang Y, Li J. Genes controlling plant architecture. *Curr Opin Biotech*. 2006;17:123-9.
Wang Y, Li J. Molecular basis of plant architecture. *Ann Rev Plant Biol*. 2008;59:253-79.

Wang X, Song W, Yang Z, Wang Y, Tang Z, Xu C. Improved genetic mapping of endosperm traits using NCIII and TTC designs. *J Heredity*. 2009a;100:496-500.

Wang JW, Wang LJ, Mao YB, Cai WJ, Xue HW, Chen XY. Control of root cap formation by microRNA-targeted auxin response factors in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 2005;17:2204-16.

Wang X, Xu C, Wu R, Larkins BA. Genetic dissection of complex endosperm traits. *Trends Plant Sci*. 2009b;14:391-8.

Wen M, Wang H, Xia Z, Zou M, Lu C, Wang W. Development of EST-SSR and genomic-SSR markers to assess genetic diversity in *Jatropha curcas* L. *BMC Research Notes*. 2010;3:42.

Williams L, Carles CC, Osmont KS, Fletcher JC. A database analysis method identifies an endogenous trans-acting short-interfering RNA that targets the *Arabidopsis* ARF2, ARF3, and ARF4 genes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005;102:9703-8.

Worley B, Powers R. Multivariate Analysis in Metabolomics. *Current Metabolomics*. 2013; 1, 92-107.

Wu MF, Tian Q, Reed JW. *Arabidopsis* microRNA167 controls patterns of ARF6 and ARF8 expression, and regulates both female and male reproduction. *Development*. 2006;133:4211-8.

Vasudevan R, Ramashandran S. Somatic embryogenesis of *Jatropha curcas* from ovules. 2010; US Patent: WO 2010/011184 A1 1-21.

Vinocur B, Altman A. Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations. *Curr Opin Biotechnol*. 2005;16:123-32.

Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van de Lee Th, Hornes M, et al. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res*. 1995;23:4407-14.

Villas-Bôas S, Mas S, Akesson MS, Nielsen J. Mass spectrometry in metabolome analysis. *Mass Spectrometry Reviews*. 24, 613-646, 2004.

Xu D, Duan X, Wang B, Hong B, Ho THD, Wu R. Expression of a late embryogenesis abundant protein gene, HVA1, from barley confers tolerance to water deficit and salt stress in transgenic rice. *Plant Physiol*. 1996;110:249-57.

Yang JH, Han SJ, Yoon EK, Lee WS. Evidence of an auxin signal pathway, microRNA167- ARF8-GH3, and its response to exogenous auxin in cultured rice cells. *Nucleic Acids Res*. 2006;34:1892-9.

Yi C, Zhang S, Liu X, Bui HTN, Hong Y. Does epigenetic polymorphism contribute to phenotypic variances in *Jatropha curcas* L. *BMC Plant Biol*. 2010;10:259.

Zhang H, Ogas J. An epigenetic perspective on developmental regulation of seed genes. *Mol Plant*. 2009;2:610-27.

Zhang JF, Qi CK, Pu HM, Chen S, Chen F, Gao J-Q, et al. QTL identification for fatty acid content in rapeseed (*Brassica napus* L.). *Acta Agron Sin*. 2008;34:54–60.

Zhang X, Yazaki J, Sundaresan A, Cokus S, Chan SW-L, Chen H, et al. Genome-wide high-resolution mapping and functional analysis of DNA methylation in *Arabidopsis*. *Cell*. 2006;126:1189-201.

Zheng P, Allen WB, Roesler K, Williams ME, Zhang S, Li J, et al. A phenylalanine in DGAT is a key determinant of oil content and composition in maize. *Nat Genet*. 2008;40:367–72.