

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**ESTUDO DA DIVERSIDADE GENÉTICA EM ACESSOS DE  
*Jatropha* spp. POR MEIO DE CARACTERES  
MORFOLÓGICOS E MARCADORES MOLECULARES ISSR**

**Mariana Silva Rosa Pazeto  
Engenheira Agrônoma**

**2013**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**ESTUDO DA DIVERSIDADE GENÉTICA EM ACESSOS DE  
*Jatropha* spp. POR MEIO DE CARACTERES  
MORFOLÓGICOS E MARCADORES MOLECULARES ISSR**

**Mariana Silva Rosa Pazeto**

**Orientador: Prof. Dr. Antonio Orlando Di Mauro**

**Coorientadora: Profa. Dra. Sandra Helena Unêda-Trevisoli**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas).

**2013**

P499a Pazeto, Mariana Silva Rosa  
Estudo da diversidade genética em acessos de *Jatropha* spp. por meio de caracteres morfológicos e marcadores moleculares ISSR. / Mariana Silva Rosa Pazeto. -- Jaboticabal, 2013  
xi, 63 f. : il. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2013

Orientador: Antonio Orlando Di Mauro

Coorientadora: Sandra Helena Unêda-Trevisoli

Banca examinadora: Gustavo Vitti Môro, José Baldin Pinheiro, Elizabeth Ann Veasey, Luciana Rossini Pinto

Bibliografia

1. Germoplasma. 2. *Jatropha curcas*. 3. *Jatropha pohliana*. 4. *Jatropha gossypifolia*. 5. Variabilidade. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 631.52:582.682.1

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

## **DADOS CURRICULARES DA AUTORA**

**MARIANA SILVA ROSA PAZETO** - nascida em 31 de maio de 1982 em Ribeirão Preto - SP - Brasil. Em 2001, iniciou o curso de Engenharia Agrônômica na Universidade de São Paulo - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, em Piracicaba - SP - concluindo-o em julho de 2006. Foi bolsista de iniciação científica da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), na área de Genética e Melhoramento de Plantas, nos períodos de fevereiro de 2003 a fevereiro de 2004 e fevereiro de 2005 a fevereiro de 2006. Em março de 2007 iniciou o curso de mestrado *Stricto Sensu* em Agronomia, com Área de Concentração em Produção e Tecnologia de Sementes, na Universidade Estadual Paulista - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Câmpus de Jaboticabal - SP. Durante o período de realização do curso foi bolsista da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). Em março de 2009, nessa mesma Universidade, iniciou o curso de doutorado *Stricto Sensu* em Agronomia, com Área de Concentração em Genética e Melhoramento de Plantas. Durante o período de realização do curso foi bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

“Agradeço todas as dificuldades que enfrentei;  
não fosse por elas, eu não teria saído do lugar.  
As facilidades nos impedem de caminhar.  
Mesmo as críticas nos auxiliam muito.”

Chico Xavier

## DEDICO

A Deus, em primeiro lugar, pela motivação, amparo e por todas as oportunidades colocadas em meu caminho.

A você, meu filho Benício, que participou de cada minuto da fase final deste estudo, a você, meu querido, que já chegou contribuindo e já é tão amado por todos nós.

A meu querido marido, Henrique Parisi Pazeto, amor da minha vida, que esteve sempre ao meu lado durante todos esses anos de estudos, colaborando sempre com tudo o que fosse necessário e me aturando pacientemente nos momentos de estresses.

A meus pais, Reinaldo Rosa Filho e Maria Teresa Silva Rosa, meus amores e maiores exemplos de vida, me faltam gestos e palavras para lhes agradecer tamanho incentivo.

A meu irmão, Carlos Eduardo Silva Rosa, pessoa maravilhosa que me acompanhou durante toda esta trajetória.

E, não poderia deixar de mencionar, Giggio, meu Yorkshire Terrier, já nesta família há 13 anos, por nos proporcionar sempre tantas alegrias.

## **AGRADECIMENTOS**

À UNESP – Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Jaboticabal, por fornecer subsídios para esta conquista;

Ao CNPq e à FAPESP, pelo apoio financeiro a este estudo;

Ao professor Antonio Orlando Di Mauro, pela orientação, amizade e por ter me oferecido a chance de conduzir este projeto;

À professora Sandra Helena Unêda- Trevisoli, pela valiosa coorientação;

À pesquisadora Nair Helena Castro Arriel da Embrapa Algodão, pelo fornecimento de sementes para formação do Banco de Germoplasma da UNESP- FCAV.

À professora Janete Aparecida Desidério, por ter me concedido o uso de seu laboratório durante este estudo;

Ao técnico Geraldo e auxiliar de campo Rubens, pela colaboração na execução dos trabalhos de campo.

Aos demais funcionários do Departamento, Mônica, Tito, Mauro e Sebastião, por me auxiliarem em tantos momentos;

Aos companheiros do curso de pós-graduação do Laboratório de Biotecnologia e Genética Aplicada ao Melhoramento de Plantas pelo convívio maravilhoso e colaboração nos momentos de necessidades. Em especial aos amigos maravilhosos, Aretha, Viviane, Daniel e Claudia Denise, que foram primordiais para a concretização deste estudo;

A minha querida nova família que esteve sempre ao meu lado em todos os momentos, amenizando as dificuldades do dia a dia, sogros, Maria Teresa e Vivaldo (*in memoriam*), cunhados, Guilherme, Isabel, Fernando, Juliana e Lívia, primos e amigos, Thiago e Fabiana, sobrinhos, Víctor, Ana Clara e Julia;

Ao querido Thiago Parisi, primo e amigo estimado, pela edição das Figuras deste trabalho;

Aos amigos queridos que sempre incentivaram minha carreira acadêmica, Aline, Juliane, Magnólia, Daniela, Giovana, Ana Luiza, Márcia (Cindi), Aline Beatriz (Líbi) e Renata (Taquase);

E a todos aqueles que de algum modo contribuíram para esta conquista.

**MUITO OBRIGADA!**

**SUMÁRIO**

	Página
<b>RESUMO</b> .....	viii
<b>ABSTRACT</b> .....	ix
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	4
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	14
<b>3.1 Material vegetal</b> .....	14
<b>3.2 Preparo de mudas</b> .....	14
<b>3.3 Plantio no campo</b> .....	15
<b>3.4 Dificuldades surgidas</b> .....	15
<b>3.5 Avaliações em campo</b> .....	16
<b>3.6 Extração de DNA genômico</b> .....	20
<b>3.7 Quantificação de DNA</b> .....	25
<b>3.8 Obtenção dos marcadores ISSR</b> .....	25
<b>3.9 Análises estatísticas</b> .....	26
<b>3.9.1 Avaliações agromorfológicas</b> .....	26
<b>3.9.2 Avaliações moleculares</b> .....	26
<b>4. RESULTADOS</b> .....	28
<b>4.1 Análise dos dados agromorfológicos</b> .....	28
<b>4.2 Otimização dos protocolos de extração de DNA</b> .....	36
<b>4.3 Análise dos dados moleculares</b> .....	38
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	47
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	53
<b>7. REFERÊNCIAS</b> .....	54



## ESTUDO DA DIVERSIDADE GENÉTICA EM ACESSOS DE *Jatropha* spp. POR MEIO DE CARACTERES MORFOLÓGICOS E MARCADORES MOLECULARES ISSR

**RESUMO** - O gênero *Jatropha* pertencente à família Euphorbiaceae possui cerca de 170 espécies distribuídas nas regiões semi-áridas tropicais da África e das Américas. Dentre as espécies do gênero *Jatropha*, encontram-se o pinhão-manso (*J. curcas* L.), o pinhão-bravo (*J. pohliana* Müell), como é conhecido no Brasil e o pinhão-roxo (*J. gossypiifolia* L.). Estudos da variabilidade fenotípica e genética de uma população são importantes para melhoristas de plantas, pois auxiliam na caracterização de acessos, além de facilitar na seleção de parentais para cruzamentos direcionados. Assim, o presente estudo objetivou avaliar acessos de três espécies do gênero *Jatropha* de diferentes regiões do Brasil, por meio de caracteres morfológicos e marcadores moleculares ISSR, visando agrupá-los de acordo com o grau de divergência existente. Observou-se maior variabilidade interespecífica do que intraespecífica para grupos de acessos, tanto para caracteres morfológicos quanto para moleculares. Caracteres qualitativos e quantitativos mostraram variabilidade entre acessos e poderão servir como base em estudos genéticos futuros de espécies *Jatropha*. Não houve relação entre o padrão de similaridade e a procedência geográfica de acessos nas análises de agrupamentos pelo método UPGMA. A porcentagem média de polimorfismo encontrada para marcadores ISSR entre os acessos estudados foi de 40,6%. Houve maior similaridade genética entre acessos de *J. pohliana* e *J. gossypiifolia* e menor entre *J. pohliana* e *J. curcas*.

**Palavras-chave:** germoplasma, *Jatropha curcas*, *Jatropha gossypiifolia*, *Jatropha pohliana*, variabilidade

## STUDY OF THE GENETIC DIVERSITY OF *Jatropha* spp. ACCESS BY MORPHOLOGICAL CHARACTERS AND ISSR MOLECULAR MARKER

**ABSTRACT** - The genus *Jatropha* belongs to the Euphorbiaceae family, it has about 170 species distributed in tropical semi- arid regions of Africa and the Americas. Among the species of *Jatropha* are physic nut (*J. curcas* L.), pinhão-bravo (*J. pohliana* Müell), as is known in Brazil and purple pinion (*J. gossypiifolia* L.). Studies of phenotypic and genetic variability of a population are important for plant breeders, as they help in the characterization of accessions, and facilitate the selection of parents for crosses targeted. Thus, the present study aimed to evaluate *Jatropha* accessions of three species by morphological characters and ISSR molecular markers in order to group them according to the degree of divergence. There was greater variability in interspecific than intraspecific groups to access, both for morphological and molecular characters. Qualitative and quantitative characters showed variability among accessions and could serve as a basis for future genetic studies of *Jatropha* species. There was no relation between the pattern of similarity and geographic origin of accessions in the cluster analysis by UPGMA. The average percentage of polymorphism for ISSR found among the accessions studied was 40.6%. There was greater genetic similarity among accessions of *J. pohliana* and *J. gossypiifolia* and lower among *J. pohliana* and *J. curcas*.

**Keywords:** germoplasm, *Jatropha curcas*, *Jatropha gossypiifolia*, *Jatropha pohliana*, variability

## 1. INTRODUÇÃO

Estamos vivendo em todo o mundo uma grande e possivelmente duradora transição energética, visto que hoje, a matriz energética é quase totalmente dependente do petróleo e do carvão mineral. Devido à dimensão continental do Brasil e da sua diversidade de climas e solos, estima-se que o país tenha condições de liderar a produção mundial de biodiesel, promovendo a substituição de, pelo menos, 60% do óleo diesel consumido em todo o mundo (BRASIL, 2005).

Os principais insumos para a produção de biodiesel são os óleos vegetais. A maior parte desses óleos, tais como os óleos de soja, palma, girassol, canola, entre outros, são utilizados tanto para fins alimentícios como energéticos, enquanto outras espécies, por sua toxicidade, destinam-se somente para o uso industrial, como os óleos de mamona e pinhão-manso. Recentemente surgiu o interesse pelo pinhão-manso, que tem a vantagem de ser perene, possivelmente nativo do Brasil, e com possibilidade de ser mais uma alternativa para a produção de óleo de boa qualidade para a produção de biodiesel no país, liberando os outros óleos para fins alimentícios, determinando, assim, equilíbrio entre demanda e produção, o que resulta na estabilidade de preços. Salienta-se que uma das preocupações da União Européia e de outros potenciais importadores é exatamente essa. Em termos mundiais existe pouco conhecimento sobre espécies do gênero *Jatropha* e somente nos últimos 30 anos é que foram iniciados estudos agronômicos sobre *J. curcas*, sendo, no entanto, uma planta ainda não domesticada (SATURNINO et al., 2005).

Fazendo-se um breve levantamento da pesquisa para pinhão-manso, em termos nacionais e mundiais, onde nem sequer existem estatísticas com dados de produção, produtividade, teor de óleo, etc, obtidos em cada país, percebe-se que há muito a se fazer em termos de pesquisa, desenvolvimento e inovação tecnológica, e que há necessidade urgente de investimentos. Segundo Arruda et al. (2004), não se conhece quase nada da bioquímica e da fisiologia da planta, e alguns aspectos agronômicos devem ser mais bem estudados, pois ela tem elevada variabilidade natural, possuindo grande diversidade genética com polinização preferencialmente entomófila, podendo ter progressivamente elevada alogamia. Como não existem cultivares definidas, existe a necessidade urgente de se escolher e caracterizar

acessos promissores de espécies *Jatropha*, para a criação de um banco de germoplasma, que servirá de base para um programa de melhoramento genético do gênero.

A base para o sucesso de um programa de melhoramento genético é a variabilidade genética e por isso, é primordial o conhecimento da diversidade genética existente em populações naturais (CRUZ; REGAZZI; CARNEIRO, 2012). Diversas técnicas de biologia molecular estão disponíveis atualmente para detecção de polimorfismo genético diretamente em nível de DNA, auxiliando na avaliação das relações genéticas entre genótipos. Os marcadores moleculares fornecem um alto grau de polimorfismo, são distribuídos aleatoriamente ao longo de todo o genoma e por serem praticamente livres de efeitos ambientais e estádios fisiológicos das plantas, permitem uma identificação precoce e precisa dos genótipos de interesse.

Os marcadores moleculares têm sido amplamente utilizados na caracterização da diversidade genética entre e dentro de genótipos de uma população, geralmente por meio da similaridade ou dissimilaridade genética (CORRÊA et al., 1999; MÜHLEN; MARTINS; ANDO, 2000; PRIOLLI et al., 2002; MEYER et al., 2004; ARRIEL et al., 2006). Nessas condições a diversidade estudada por marcadores de DNA e descritores morfológicos têm maior potencial de detecção de variabilidade.

Dentre os marcadores moleculares disponíveis encontram-se o RAPD ("Random Amplified Polymorphic DNA") e o ISSR ("Inter Simple Sequence Repeat"), ambos apresentam a característica de dominância, ou seja, não permitem diferenciar indivíduos homozigóticos de heterozigóticos. A técnica RAPD apresenta as vantagens da praticidade de execução, facilidade na obtenção de dados, custo relativamente reduzido quando comparada a outras técnicas moleculares, e aplicabilidade imediata a organismos de qualquer natureza, sem a necessidade de conhecimento prévio de seu genoma, porém uma de suas desvantagens é sua baixa reprodutibilidade. A técnica ISSR, por sua vez, apresenta todas as vantagens citadas para a técnica RAPD e, além disso, possui um elevado grau de reprodutibilidade, possivelmente resultante do comprimento dos "primers" empregados (16 a 25 pb), permitindo, ainda, temperaturas de pareamento mais estridentes (entre 45 e 60 °C) (CAIXETA et al., 2006). O RAPD e ISSR caracterizam-

se pela dominância, no entanto são ótimas ferramentas para serem empregadas em estudos iniciais de diversidade genética de populações. Esses iniciadores são amplificados via Reação de Polimerase em Cadeia (PCR – “Polymerase Chain Reaction”) (MULLIS; FALOONA, 1987).

Assim, a avaliação da diversidade genética em acessos de *Jatropha* spp. se torna útil no âmbito de fornecer aos melhoristas informações genéticas adicionais e mais detalhadas de acessos, aumentando a probabilidade de obtenção de genótipos superiores a serem utilizados na indústria de biodiesel. Desse modo, o objetivo deste trabalho foi avaliar a diversidade genética das espécies *Jatropha curcas*, *Jatropha pohliana* e *Jatropha gossypifolia*, procedentes de quatro estados do Brasil, utilizando-se para isso, caracteres morfoagronômicos e marcadores moleculares ISSR.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

O gênero *Jatropha* (Euphorbiaceae) encontra-se representado por cerca de 170 espécies, estando distribuídas nas regiões semi-áridas tropicais da África e das Américas, e foi dividido em dois subgêneros (*Jatropha* e *Curcas*). O subgênero *Jatropha* é o que possui maior distribuição, tendo espécies encontradas na África, Índia, América do Sul, Antilhas, América Central e Caribe. O subgênero *Curcas*, com exceção do pinhão-mansinho (*Jatropha curcas* L.) está restrito ao México e regiões adjacentes (deserto do Saara, Arizona e Texas) (DEHGAN; WEBSTER, 1979).

Dentre as espécies do gênero *Jatropha*, encontram-se o pinhão-mansinho (*Jatropha curcas* L.), o pinhão-bravo (*Jatropha pohliana* Muell) e o pinhão-roxo (*Jatropha gossypifolia* L.). Essas espécies têm sido estudadas devido ao alto teor de óleo encontrado em suas sementes, representando uma importante fonte para a produção de biodiesel. De acordo com Teixeira (1987), as sementes de pinhão-mansinho e pinhão-bravo podem apresentar em média 34 e 24% de óleo, respectivamente, e segundo Oliveira et al. (2006), o teor de óleo do pinhão-roxo é de aproximadamente 23%. Análises realizadas por Tominaga, Kakida e Yasuda (2007) apontam os seguintes teores de óleo nas sementes de pinhão-mansinho: pela extração mecânica, 33 a 34%, pela extração mecânica e química, 38 a 40% e, pela extração de óleo somente de albúmen, 58 a 60%.

### **Pinhão-mansinho**

A espécie *Jatropha curcas* L. (pinhão-mansinho) é provavelmente originária do Brasil, tendo sido introduzida por navegadores portugueses nas Ilhas do arquipélago Cabo Verde e Guiné, de onde foi disseminada pelo continente Africano (ARRUDA et al., 2004) e atualmente está distribuída em todas as regiões tropicais do globo.

Segundo Cortesão (1956) e Peixoto (1973), sua distribuição geográfica é bastante vasta devido a sua rusticidade, resistência a longas estiagens e pragas, se adaptando a uma gama de condições edafoclimáticas muito variáveis, desde o Nordeste até São Paulo e Paraná até o Norte do País. Segundo estes autores, o pinhão-mansinho se desenvolve bem tanto nas regiões tropicais secas como nas zonas

equatoriais úmidas, assim como nos terrenos áridos e pedregosos, podendo suportar longos períodos de seca.

A pinha de purga, como também é conhecido em algumas regiões do Brasil, é uma subárvore, que alcança de dois a cinco metros de altura, possui frutos com três sementes de dois centímetros por onze milímetros de largura e nove milímetros de espessura, oblongas e pretas. Suas folhas jovens geralmente são avermelhadas, se tornando verdes com o tempo, têm de três a cinco lóbulos, pecioladas, alternas, com nervuras esbranquiçadas e salientes na face inferior da lâmina foliar, e suas flores são monóicas, pequenas e amarelo-esverdeadas. Seu plantio pode ser feito por mudas, sementes ou estacas. É uma cultura perene, suas árvores duram aproximadamente 35 anos. Cada planta produz até vários quilogramas de sementes em um ano (DRUMMOND et al., 1984).

De acordo com Cortesão (1956) e Brasil (1985), citado em Pinhão-Manso (2011) seu tronco tem diâmetro de cerca de 20,00 cm, possui raízes rasas e pouco ramificadas, caule liso, de lenho mole e medula desenvolvida, porém pouco resistente. Qualquer ferimento faz correr o látex em abundância que circula em seu floema. O tronco é ramificado desde a base, possui numerosas cicatrizes devido à queda das folhas na estação seca, as quais ressurgem logo após as primeiras chuvas.

É uma planta tipicamente tropical, preferindo regiões quentes, apesar de ter suportado bem o frio em alguns casos. De acordo com Tominaga, Kakida e Yasuda (2007), para uma boa produção, o ideal são valores de 600 mm de chuva por ano e temperaturas médias de 18 a 28,5 °C. Apesar de ser adaptado a regiões secas e do caule que armazena bastante água, nos períodos de seca apenas sobrevive, diminuindo sua produção de sementes (DRUMMOND et al., 1984).

Começam a produzir com sete a oito meses, chegando à plena produção com dois a quatro anos. Essa produção depende do regime de chuvas, umidade e fertilidade do solo. Se o terreno for fresco, recebendo chuvas regulares, o pinhão-manso pode produzir o ano inteiro, tendo colheitas mensais. Em caso de regiões mais secas, os frutos podem ser colhidos de fevereiro a abril. O método mais prático e rápido de colheita dos frutos é fazendo vibrar a planta à meia altura, o que provoca a queda somente dos frutos maduros (DRUMMOND et al., 1984).

Em termos de produtividade, segundo Carnielli (2003) citado em Pinhão-Manso (2011), o pinhão-manso produz, pelo menos, duas toneladas de óleo por hectare.

Atualmente, o pinhão-manso não está sendo explorado comercialmente no Brasil, devido à sua proibição de plantio, pelo Ministério da Agricultura, por não existirem cultivares registradas. No entanto, segundo Purcino e Drummond (1986) e Carnielli (2003) esta planta é uma excelente produtora de óleo com todas as qualidades necessárias para ser transformado em biodiesel. Além desta aptidão para produção de biodiesel, o pinhão-manso, por ser perene, é uma planta de fácil cultivo, com baixos custos de produção e possível de ser cultivada economicamente em quase todas as regiões brasileiras. Acredita-se, por isso, que esta planta é altamente promissora como fonte energética renovável sob ponto de vista econômico e social.

### **Pinhão-bravo**

O pinhão-bravo (*Jatropha pohliana*), por sua vez, pode ser encontrado nas variedades molissima, subgrabra e velutina. Trata-se de um arbusto lenhoso, com folhas longo-pecioladas e bordas espinhosas. Sua inflorescência se dá em cimos, as flores são amarelo-esverdeadas com raias vermelhas. O fruto é deiscente, com três sementes, e de dimensões menores que as do pinhão-manso (EPAMIG, 2003). *J. pohliana* destaca-se como uma oleaginosa potencial para ser utilizada na produção de biodiesel, mas alguns aspectos negativos precisam ser avaliados, como a sua toxicidade e a grande quantidade de ácido linoléico, este último devido à sua estrutura favorecer a formação de reações de polimerização, o que pode dificultar a queima completa na câmara de combustão do motor (CONCEIÇÃO et al., 2007).

A literatura disponível a respeito dessa espécie é bastante escassa, o que evidencia a necessidade de estudos tanto morfológicos quanto moleculares.



## **Pinhão-roxo**

Outra espécie do gênero *Jatropha*, e que também se encontram pouquíssimas informações na literatura, é o pinhão-roxo (*J. gossypifolia*), encontrado em locais onde o pinhão-manso não prospera. Trata-se de um arbusto mais frágil, com propriedades purgativas mais intensas que as do pinhão-manso. As folhas jovens são avermelhadas, flores violáceas, inflorescência em cimeiras, cápsula ovóide e subglobosa, com três lóculos contendo três sementes oleaginosas, também de dimensões inferiores às do pinhão-manso (PINHÃO-MANSO, 2011).

## **Biodiesel de pinhão-manso e pinhão-bravo versus diesel de petróleo**

Experimentos realizados com o óleo extraído do pinhão-manso em comparação com o diesel de petróleo apresentaram resultados satisfatórios. Num motor diesel, para gerar a mesma potência, o consumo de óleo de pinhão-manso foi 20% superior, o ruído mais suave e a emissão de fumaça, semelhante. No entanto, a emissão de enxofre é cerca de dez vezes menor. Análises posteriores mostraram que o óleo de pinhão-manso possui parâmetros semelhantes ao do combustível fóssil, com 83,9% do seu poder calorífico e o óleo de pinhão-bravo, 77,2%. Se o óleo de pinhão-manso for usado como substituto ao diesel, o consumo será 16,1% maior; se a experiência for feita com o óleo de pinhão-bravo, será 21,8% maior (PINHÃO-MANSO, 2011).

## **Pinhão-manso versus Biodiesel: uma visão de futuro**

O biodiesel é uma denominação genérica para combustíveis e aditivos derivados de fontes renováveis. Comparado ao óleo diesel derivado de petróleo, o biodiesel pode reduzir em 78% as emissões de gás carbônico, considerando-se a reabsorção pelas plantas (ACCARINI, 2006). Além disso, reduz em 90% as emissões de fumaça e praticamente elimina as emissões de óxido de enxofre (SOUSA, 2006). É importante frisar que o biodiesel pode ser usado em qualquer motor de ciclo diesel, com pouca ou nenhuma necessidade de adaptação, podendo

se tornar um importante produto para exportação e para a independência energética nacional, associada à geração de emprego e renda nas regiões mais carentes do Brasil.

Pela extensão territorial do país, suas excelentes condições edafoclimáticas, recursos humanos e eficiente tecnologia desenvolvida por seus pesquisadores e técnicos, o Brasil é considerado o paraíso para a produção de biomassa para fins alimentares, químicos e energéticos. A nova orientação da agricultura energética é no sentido de produzir matérias-primas para o biodiesel, ou seja, os óleos vegetais, além do álcool (ACCARINI, 2006). A principal fonte de óleos vegetais, atualmente no Brasil, é a soja, que vem ocupando áreas maiores ano após ano. Em segundo lugar encontra-se o dendê (palma), junto a outras oleaginosas anuais como o girassol, a mamona, a canola, o algodão e o amendoim (CONAB, 2012). No entanto, outras espécies são indicadas como potencialidades para o futuro, algumas anuais, como o nabo forrageiro, outras perenes, como o pinhão-manso (GÓIS et al., 2006).

Conforme já destacado, em função do reconhecimento do aquecimento global e de suas causas pelos líderes mundiais e pela população em geral, teme-se uma grande demanda de óleos alimentícios, o que provocaria desequilíbrios na relação oferta/demanda, com sérias consequências sociais.

Assim, alternativas de menor impacto sócio-econômico devem ser procuradas. Dentre essas alternativas encontra-se o pinhão-manso, porém são necessários estudos sobre a cultura, que é ainda considerada selvagem e sobre a qual existe pouco conhecimento técnico-científico. Na realidade, ainda não foram encontradas na literatura relatos sobre pesquisas científicas a longo prazo relacionadas ao pinhão-manso. Existem apenas estimativas preliminares de produção e de produtividade obtidas pela extrapolação de dados obtidos em plantas isoladas; e a maior parte dos trabalhos científicos são estudos básicos realizados em laboratório ou casa-de-vegetação sobre temas específicos como botânica, fisiologia, toxicidade de suas partes, produção de mudas, tecnologia de sementes, transesterificação do óleo, etc.

Em trabalhos de revisão de literatura nacionais mais recentes sobre a cultura do pinhão-manso, Arruda et al. (2004) e Saturnino et al. (2005), observa-se que grande parte dos pesquisadores brasileiros tem uma visão otimista, porém

pragmática, a respeito desta cultura, uma vez que não existe nada ainda definido sobre a viabilidade da cultura, sistema de cultivo ideal e variabilidade genética. No entanto, há indicações de que a cultura tem possibilidade de exploração comercial inclusive em assentamentos, dado o potencial de lucratividade derivado da sua produção, adaptação e rusticidade.

### **Diversidade genética por meio de técnicas moleculares**

A divergência genética (ou similaridade genética) entre os genótipos é muito útil na seleção de combinações entre parentais para formação de populações segregantes, bem como para a manutenção da diversidade genética em programas de melhoramento. Essas estimativas revelam disponibilidade de alelos substitutos para caracteres de interesse, que são a base para ganhos de seleção a longo prazo. Cruzamentos entre parentais geneticamente divergentes proporcionam uma variabilidade genética entre progênies bem maior do que as obtidas em cruzamentos entre plantas com maior grau de parentesco e, com isso, aumentam as oportunidades do melhorista obter progênies superiores (MESSMER et al., 1993).

Atualmente os iniciadores moleculares têm sido empregados como forma de avaliar a similaridade genética de maneira mais precisa (CAIXETA et al., 2006). O desenvolvimento e aplicação de tecnologias baseadas em iniciadores moleculares fornecem ferramentas únicas, capazes de revelar polimorfismos ao nível da sequência do DNA, suficientes para discriminar a variação genética entre indivíduos e dentro de populações (KRESOVICH; SZEWC-MCFADDEN; BLICK, 1995).

Com os avanços de técnicas modernas de biologia molecular, surgiram diversos métodos de detecção de polimorfismo genético diretamente ao nível de DNA (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). Nos últimos anos, novas técnicas, que auxiliam na avaliação das relações genéticas entre genótipos foram desenvolvidas, acompanhando o rápido e constante avanço na área da genética molecular. Os marcadores dominantes, conforme já salientado, podem auxiliar em estudos de divergência genética, pois permitem identificar diferenças diretamente no material genético e podem revelar, para uma dada região do DNA, uma banda ou marca que permite comparar os indivíduos em estudo quanto à sua presença ou ausência. As

bandas reveladas são codificadas pelo número 1 e as não reveladas pelo número 0. Dessa forma, os dados, aos quais serão aplicados métodos estatísticos, provêm dessa matriz de uns e zeros (MEYER, 2002). Ao se trabalhar com alelos codominantes, a matriz formada será também binária, porém do tipo 1 e 2, podendo cada indivíduo ser, por exemplo, homocigótico dominante (11), quando o indivíduo estudado possui apenas a marca de número 1 no gel ou homocigótico recessivo (22), quando possui apenas a marca de número 2 ou, ainda, heterocigótico (12), quando no gel aparecem as duas marcas.

Com o surgimento da Reação de Polimerase em Cadeia (PCR – “Polymerase Chain Reaction”) (MULLIS; FALOONA, 1987), aliou-se o poder da informação gerada por iniciadores moleculares e a rapidez da técnica baseada em ciclos contínuos de desnaturação e amplificação das fitas de DNA, mediados pela enzima DNA polimerase em pontos específicos do genoma, determinados pelo pareamento de iniciadores ou “primers” (sequência de nucleotídeos de tamanho pequeno, variando geralmente entre 10 e 30 bases) específicos de sequências complementares a este ponto. Várias outras técnicas utilizam o princípio da técnica de PCR, tais como os iniciadores do tipo: RAPD – “Random Amplified Polymorphic” (WILLIAMS et al., 1990); ISSR – “Inter Simple Sequence Repeat” (GODWIN; AITKEN; SMITH, 1997), SCAR – “Sequence Characterized Amplified Regions” (PARAN; MICHELMORE, 1993); SSR – “Simple Sequence Repeats” (LITT; LUTTY, 1989); AFLP – Amplified Fragment Length Polymorphism (VOS et al., 1995) e SNP’s – “Single Nucleotide Polymorphisms” (COLLINS; BROOKS; CHAKRAVARTI, 1998). Dentre esses iniciadores, destacam-se os estudos de divergência iniciados utilizando iniciadores RAPD e ISSR, pela simplicidade, facilidade e baixo custo. Na etapa posterior, de refinamento, é aconselhável o emprego de iniciadores mais eficientes em termos de reprodutibilidade.

Os ISSR (ZIETKIEWICZ; RAFALKI; LABUDA, 1994; REDDY; SARLA; SIDDIQ, 2002) são iniciadores baseados em microssatélites, que não necessitam de conhecimento prévio da sequência do genoma, mostrando-se ótimas ferramentas a serem empregadas em estudos iniciais de espécies. Enquanto os SSR são baseados na amplificação da região repetida usando dois “primers” loco-específicos, em ISSR, um único “primer” composto por uma sequência do microssatélite

usualmente de 16-25 pares de bases de comprimento é utilizado para amplificar principalmente as seqüências inter-SSR de diferentes tamanhos. Estes primers podem estar desancorados ou usualmente ancorados na extremidade 5' ou 3' por 1 a 4 bases degeneradas. Os alelos polimórficos ocorrem sempre que em um genoma esteja faltando a seqüência repetida ou exibem uma deleção ou inserção que modifica a distância entre as repetições. Para os "primers" ancorados na posição 5', polimorfismos ocorrem também devido às diferenças no comprimento do microsatélite. As seqüências de repetições e de nucleotídeos ancorados são selecionadas aleatoriamente. Embora ISSR sejam iniciadores dominantes, possuem a vantagem de analisar *loci* múltiplos em uma única reação (GOULÃO; OLIVEIRA, 2001). O método fornece resultados altamente reprodutíveis e gera abundante polimorfismo em muitos sistemas. A maioria dos trabalhos tem usado eletroforese no gel de agarose com coloração por brometo de etídio ou eletroforese no gel de poli-acrilamida, segundo Liu e Wendel (2001). A exemplo dos microsatélites, os marcadores ISSR têm tido, atualmente, grande aplicabilidade em estudos genéticos. Culturas de maior importância econômica têm sido avaliadas com esses marcadores em relação à variabilidade genética de acessos e espécies silvestres visando resultados que auxiliem em programas de melhoramento para estas espécies (ALMEIDA, 2006).

Métodos estatísticos de análise podem ser aplicados para auxiliar estudos de divergência genética. As matrizes de similaridade ou de dissimilaridade entre acessos podem ser calculadas de diversas formas, sendo que diferentes propostas são encontradas na literatura (SNEATH; SOKAL, 1973; JOHNSON; WICHERN, 1988; WEIR, 1996). Considerando que os resultados dos agrupamentos podem ser influenciados pela escolha do coeficiente de similaridade (GOWER; LEGENDRE, 1986; JACKSON; SOMERS; HARVEY, 1989; DUARTE; SANTOS; MELO, 1999), estes coeficientes precisam ser mais bem estudados, de forma que os mais eficientes em cada situação específica possam ser empregados (DUARTE; SANTOS; MELO, 1999).

A análise de agrupamento permite classificar  $n$  itens (populações, clones, variedade, indivíduos, etc.) avaliados por um conjunto  $p$  de variáveis, cujo objetivo é identificar e separar os itens em grupos, de forma que os mais semelhantes

permaneçam no mesmo grupo. Em todos os casos se desconhece “a priori” o número e a composição dos diferentes grupos ou “clusters” a serem formados.

Atualmente, a técnica é muito usada principalmente por pesquisadores da área de melhoramento genético, em estudos de divergência e estudos evolutivos. Esse tipo de análise tem por finalidade reunir, por algum critério de classificação, qualquer tipo de unidade amostral em vários grupos, de tal forma que exista homogeneidade dentro do grupo e heterogeneidade entre grupos (BUSSAB; MIAZAKI; ANDRADE, 1990; DIAS, 1998; MEYER, 2002; CRUZ; REGAZZI; CARNEIRO, 2012).

Inicia-se o processo definindo-se os indivíduos e os objetivos desejados para a aplicação da análise, além dos critérios que irão definir as similaridades entre eles. Obtidos esses dados, eles são dispostos na forma de uma matriz, que representam os indivíduos de interesse e as linhas representam as variáveis. A matriz de dissimilaridade é gerada a partir de amostras de  $n$  itens, totalizando  $n(n-1)/2$  pares dissimilares. A seguir um algoritmo de agrupamento é aplicado sobre essa matriz, de modo a identificar e conectar grupos homogêneos. Tais grupos são representados graficamente em um diagrama de árvore denominado dendrograma (DIAS, 1998; MEYER, 2002; ARRIEL, 2004).

Poucos trabalhos a fim de se conhecer a diversidade genética de *Jatropha* spp. foram realizados no Brasil. Góis et al. (2006) avaliaram oito acessos de Minas Gerais, quatro de Goiás, um do Espírito Santo e um de Sergipe por meio da técnica de isoenzimas, encontrando acessos altamente similares e outros bem divergentes. Divakara et al. (2010) em uma revisão sobre os aspectos biológicos e o melhoramento de *Jatropha curcas* reúne em uma tabela nove referências sobre trabalhos que utilizaram marcadores moleculares para caracterizar acessos em pinhão-manso, dentre esses, Basha e Sujatha (2007) avaliaram 42 acessos de *J. curcas* L. de diferentes regiões da Índia. Esses autores usaram “primers” RAPD e ISSR para determinar a diversidade genética desses acessos e concluíram a necessidade imediata de aumentar a base genética do pinhão-manso na Índia, devido à baixa diversidade genética encontrada entre os acessos. Ainda registraram marcas específicas para determinadas regiões, conseguindo diferenciar especificamente materiais com origens diversas.

Em razão do exposto, por meio da caracterização da diversidade disponível para trabalhos de conservação, manutenção e enriquecimento da base genética, será possível promover o melhoramento e desenvolvimento destas culturas do melhor modo, fornecendo-se uma medida confiável dessa variabilidade. Assim essa informação poderá ser utilizada tanto para a identificação de indivíduos que contenham contribuição gênica desejável para caracteres de interesse, quanto para a avaliação de caracteres de difícil mensuração, e ainda, proporcionando o primeiro passo para o entendimento da biologia e estrutura de muitos caracteres.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Material vegetal

Neste trabalho foram estudados 84 acessos, sendo 76 de *Jatropha curcas* (pinhão-manso), sete de *Jatropha pohliana* (pinhão-bravo) e um de *Jatropha gossypifolia* (pinhão-roxo) procedentes de quatro estados brasileiros, Paraíba, Pernambuco, Tocantins e São Paulo (Tabela 1). A maior parte das sementes utilizadas foram conseguidas junto ao Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Algodão, Campina Grande – PB, no entanto, foram utilizadas, também, sementes advindas de frutos colhidos de plantas espontâneas do Nordeste e Sudeste do Brasil.

Posteriormente, as sementes foram levadas ao Laboratório de Biotecnologia Aplicada ao Melhoramento de Plantas da UNESP/FCAV, onde foram devidamente identificadas com os nomes do coletor, local e data de coleta. Sementes foram selecionadas, excluindo-se, nesta fase, sementes consideradas chochas e mortas e por fim foram tratadas com o fungicida sistêmico de contato. O número de sementes final de cada acesso disponível para semeadura foi muito variável, sendo que muitos acessos apresentaram somente uma semente em condições de uso.

#### 3.2 Preparo de mudas

Em março de 2009, sementes de cada acesso de *Jatropha* spp. foram semeadas utilizando-se substrato composto por areia, terra e vermiculita em proporções iguais, em sacos plásticos com furos e com capacidade de cinco litros. Todas as sementes disponíveis de cada acesso foram semeadas, a fim de obter o máximo possível de plântulas normais e vigorosas. Os sacos foram dispostos em casa-de-vegetação com temperatura e umidade do ar controladas e irrigação manual diária, a fim de se evitar o ressecamento do substrato. Foram preparadas A aclimação das mudas foi realizada um mês após a semeadura, quando a planta já se mostrava mais resistente a estresses e atingia 15 cm de altura, feita em local fora



da casa-de-vegetação, com sombra nos horários mais quentes e exposição solar durante os mais amenos.

### **3.3 Plantio no campo**

Ao completarem dois meses após a semeadura, as mudas de todos os acessos já aclimatadas e com cerca de 30 cm de altura foram transferidas para o campo, em área experimental do Departamento de Produção Vegetal da UNESP/FCAV, o que ocorreu em maio de 2009. Devido ao número variável de sementes de cada acesso, optou-se pela avaliação morfológica de todas as plantas do banco, totalizando 391 plantas de *Jatropha* spp., no entanto, as avaliações moleculares foram realizadas utilizando-se apenas uma planta de cada acesso.

O plantio foi realizado em covas previamente adubadas com fertilizante NPK 50-60-40, com medidas de 30 x 30 cm e espaçamento de 3 x 2 m respectivamente entre linhas e plantas, cobertas com terra até o colo e irrigadas, o delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, com diferente número de repetições. Devido à baixa incidência de chuvas no período em que as mudas foram transplantadas para o campo (maio de 2009), houve a necessidade de se irrigar a área semanalmente. A cada mês foram realizadas capinas para a limpeza da área, evitando-se, assim, a proliferação de pragas e doenças nas plantas, além da competição com ervas daninhas.

O campo experimental onde se encontram os acessos possui coordenadas 21° 15' 29" S e 48° 16' 47" O e altitude média de 614 m. O clima do local é do tipo Cwa, segundo sistema de classificação de Köppen. A precipitação média anual é de 1425 mm, com temperatura média anual de 22,2 °C e umidade relativa do ar de 75% (média anual).

### **3.4 Dificuldades surgidas**

Observou-se uma alta porcentagem de sementes chochas, o que, por conseguinte acarretou a perda de material genético para este estudo.

Outro inconveniente surgido durante esta a fase de instalação do banco de germoplasma ocorreu um mês após o plantio das mudas no campo, quando se observou que algumas plantas sofreram ataque por formigas, porém a situação fora contornada e as plantas rapidamente rebrotaram, por meio do uso de formicida e também por uma técnica alternativa muito utilizada em citros, plataforma circular de plástico, adaptada no caule a um palmo acima do solo, dificultando que as formigas alcancem as folhas da planta.

### **3.5 Avaliações em campo**

Foram avaliados 17 caracteres morfológicos, tendo como critério descritores utilizados para mamona (*Ricinus communis* L.), realizando-se adaptações para colorações das espécies estudadas (EMBRAPA ALGODÃO, 2008). As avaliações foram realizadas um ano após a semeadura. Os descritores qualitativos utilizados foram:

1. Pilosidade de folhas: presente e ausente;
2. Cerosidade de caule: presente e ausente;
3. Coloração de folhas jovens, observando-se a coloração entre 80 e 120 dias após o plantio: verde, vermelha e roxa;
4. Coloração de folhas adultas, observando-se a segunda folha adulta abaixo do racemo primário, tomando-se uma média de dez folhas ao acaso: verde escuro e verde claro;
5. Coloração de nervuras foliares, observando-se a face adaxial de três folhas maduras selecionadas ao acaso em dez plantas: verde, roxa e vermelha;
6. Posição de folhas no pecíolo: opostas, alternadas e mistas;
7. Tipo de ramificação da planta, durante a maturação dos últimos cachos: trifurcada, quando do caule surgem dois ramos laterais, e nestes, mais dois, fornecendo aparência de tridente; bifurcada, quando do caule surge apenas um ramo lateral, fornecendo aparência de um caule bipartido; taça, quando do caule emergem ramos que juntos formam uma estrutura semelhante a uma taça e

universal, quando do caule surgem ramos que sobrepujam o racemo primário em altura;

8. Padrão de dez sementes: cor única, pintada, pontuada e rajada;
9. Formato de dez sementes: alongada, arredondada e achatada;
10. Tipo de carúncula: protuberante e não-protuberante;
11. Deiscência de frutos: deiscentes; semi-deiscentes e indeiscentes;

E como descritores quantitativos:

12. Número de lóbulos foliares, tomando-se uma média de dez folhas adultas do terço mediano da planta;
13. Altura de planta em centímetros;
14. Diâmetro de caule em centímetros;
15. Ciclo de maturação, que corresponde ao número de dias compreendido entre a germinação e a maturidade fisiológica, considerando-se: precoce (até 275 dias), médio (de 276-306 dias) e tardio (mais de 306 dias);
16. Comprimento de dez sementes em centímetros;
17. Largura de dez sementes em centímetros.

**Tabela 1.** Identificação dos 76 acessos de *Jatropha curcas*, sete acessos de *Jatropha pohliana* e um acesso de *Jatropha gossypifolia* avaliados. Jaboticabal, SP.

Identificação	Código do acesso	Procedência	Latitude	Longitude	Espécie	Plantas no campo
Acesso 1	CNPA PM IV P1	Tocantinópolis – TO	06°19'S	47°24'W	<i>J. curcas</i>	5
Acesso 2	CNPA PM IV P2	Tocantinópolis – TO	06°19'S	47°24'W	<i>J. curcas</i>	3
Acesso 3	CNPA PM II P1	Garanhuns – PE	08°53'S	36°30'W	<i>J. curcas</i>	7
Acesso 4	CNPA PM II P2	Garanhuns – PE	08°53'S	36°30'W	<i>J. curcas</i>	8
Acesso 5	CNPA PM II P3	Garanhuns – PE	08°53'S	36°30'W	<i>J. curcas</i>	6
Acesso 6	CNPA PM II P4	Garanhuns – PE	08°53'S	36°30'W	<i>J. curcas</i>	3
Acesso 7	CNPA PM II P5	Garanhuns – PE	08°53'S	36°30'W	<i>J. curcas</i>	5
Acesso 8	CNPA PM II P6	Garanhuns - PE	08°53'S	36°30'W	<i>J. curcas</i>	6
Acesso 9	CNPA PM II P7	Garanhuns - PE	08°53'S	36°30'W	<i>J. curcas</i>	5
Acesso 10	CNPA PM II P8	Garanhuns - PE	08°53'S	36°30'W	<i>J. curcas</i>	6
Acesso 11	CNPA PM II P9	Garanhuns - PE	08°53'S	36°30'W	<i>J. curcas</i>	6
Acesso 12	CNPA PM II P12	Garanhuns - PE	08°53'S	36°30'W	<i>J. curcas</i>	6
Acesso 13	CNPA PM II P16	Garanhuns - PE	08°53'S	36°30'W	<i>J. curcas</i>	5
Acesso 14	CNPA PM II P17	Garanhuns - PE	08°53'S	36°30'W	<i>J. curcas</i>	6
Acesso 15	CNPA PM II P19	Garanhuns - PE	08°53'S	36°30'W	<i>J. curcas</i>	5
Acesso 16	CNPA PM II P20	Garanhuns - PE	08°53'S	36°30'W	<i>J. curcas</i>	7
Acesso 17	CNPA PM II P21	Garanhuns - PE	08°53'S	36°30'W	<i>J. curcas</i>	2
Acesso 18	CNPA PM II P22	Garanhuns - PE	08°53'S	36°30'W	<i>J. curcas</i>	4
Acesso 19	CNPA PM II P24	Garanhuns - PE	08°53'S	36°30'W	<i>J. curcas</i>	6
Acesso 20	CNPA PM II P25	Garanhuns - PE	08°53'S	36°30'W	<i>J. curcas</i>	2
Acesso 21	CNPA PM II P26	Garanhuns - PE	08°53'S	36°30'W	<i>J. curcas</i>	3
Acesso 22	CNPA PM II P30	Garanhuns - PE	08°53'S	36°30'W	<i>J. curcas</i>	4
Acesso 23	CNPA PM II P31	Garanhuns - PE	08°53'S	36°30'W	<i>J. curcas</i>	3
Acesso 24	CNPA PM XI P1	Mundo Novo - PE	07°35'S	37°11'W	<i>J. curcas</i>	5
Acesso 25	CNPA PM XI P2	Mundo Novo - PE	07°35'S	37°11'W	<i>J. curcas</i>	6
Acesso 26	CNPA PM XI P3	Mundo Novo - PE	07°35'S	37°11'W	<i>J. curcas</i>	8
Acesso 27	CNPA PM XI P4	Mundo Novo - PE	07°35'S	37°11'W	<i>J. curcas</i>	8
Acesso 28	CNPA PM VII P1	Mundo Novo - PE	07°35'S	37°11'W	<i>J. curcas</i>	5
Acesso 29	CNPA PM VII P2	Mundo Novo - PE	07°35'S	37°11'W	<i>J. curcas</i>	8
Acesso 30	CNPA PM VII P6	Mundo Novo - PE	07°35'S	37°11'W	<i>J. curcas</i>	9
Acesso 31	CNPA PM VII P7	Mundo Novo - PE	07°35'S	37°11'W	<i>J. curcas</i>	9
Acesso 32	CNPA PM IX P1	Pugmil – TO	06°24'S	37°48'W	<i>J. curcas</i>	3
Acesso 33	CNPA PM IX P2	Pugmil - TO	06°24'S	37°48'W	<i>J. curcas</i>	1
Acesso 34	CNPA PM IX P3	Pugmil - TO	06°24'S	37°48'W	<i>J. curcas</i>	5
Acesso 35	CNPA PM IX P4	Pugmil - TO	06°24'S	37°48'W	<i>J. curcas</i>	4
Acesso 36	CNPA PM IX P5	Pugmil - TO	06°24'S	37°48'W	<i>J. curcas</i>	4
Acesso 37	CNPA PM IX P6	Pugmil - TO	06°24'S	37°48'W	<i>J. curcas</i>	5
Acesso 38	CNPA PM IX P7	Pugmil - TO	06°24'S	37°48'W	<i>J. curcas</i>	5
Acesso 39	CNPA PM IX P8	Pugmil - TO	06°24'S	37°48'W	<i>J. curcas</i>	3
Acesso 40	CNPA PM VIII P1	Alagoinha - PB	06°57'S	35°32'W	<i>J. curcas</i>	10
Acesso 41	CNPA PM VIII P2	Alagoinha - PB	06°57'S	35°32'W	<i>J. curcas</i>	14
Acesso 42	CNPA PM VIII P4	Alagoinha - PB	06°57'S	35°32'W	<i>J. curcas</i>	7
Acesso 43	CNPA PM VIII P5	Alagoinha - PB	06°57'S	35°32'W	<i>J. curcas</i>	9

Continuação Tabela 1.

Identificação	Código do acesso	Procedência	Latitude	Longitude	Espécie	Plantas no campo
Acesso 44	CNPA PM VI P1	Tocantinópolis - TO	10°42'S	48°54'W	<i>J. curcas</i>	6
Acesso 45	CNPA PM VI P2	Tocantinópolis - TO	10°42'S	48°54'W	<i>J. curcas</i>	5
Acesso 46	CNPA PM VI P3	Tocantinópolis - TO	10°42'S	48°54'W	<i>J. curcas</i>	9
Acesso 47	CNPA PM VI P5	Tocantinópolis - TO	10°42'S	48°54'W	<i>J. curcas</i>	4
Acesso 48	CNPA PM VI P6	Tocantinópolis - TO	10°42'S	48°54'W	<i>J. curcas</i>	7
Acesso 49	CNPA PM VI P7	Tocantinópolis - TO	10°42'S	48°54'W	<i>J. curcas</i>	6
Acesso 50	CNPA PM VI P8	Tocantinópolis - TO	10°42'S	48°54'W	<i>J. curcas</i>	5
Acesso 51	CNPA PM X P1	Marizópolis - PB	09°47'S	49°39'W	<i>J. curcas</i>	12
Acesso 52	CNPA PM X P2	Marizópolis - PB	09°47'S	49°39'W	<i>J. curcas</i>	8
Acesso 53	CNPA PM X P3	Marizópolis - PB	09°47'S	49°39'W	<i>J. curcas</i>	6
Acesso 54	CNPA PM X P4	Marizópolis - PB	09°47'S	49°39'W	<i>J. curcas</i>	7
Acesso 55	IT1	Ituverava - SP	20°20'S	47°46'W	<i>J. curcas</i>	3
Acesso 56	IT2	Ituverava - SP	20°20'S	47°46'W	<i>J. curcas</i>	2
Acesso 57	IT3	Ituverava - SP	20°20'S	47°46'W	<i>J. curcas</i>	4
Acesso 58	IT4	Ituverava - SP	20°20'S	47°46'W	<i>J. curcas</i>	2
Acesso 59	IT5	Ituverava - SP	20°20'S	47°46'W	<i>J. curcas</i>	2
Acesso 60	IT6	Ituverava - SP	20°20'S	47°46'W	<i>J. curcas</i>	2
Acesso 61	IT7	Ituverava - SP	20°20'S	47°46'W	<i>J. curcas</i>	2
Acesso 62	IT8	Ituverava - SP	20°20'S	47°46'W	<i>J. curcas</i>	1
Acesso 63	IT9	Ituverava - SP	20°20'S	47°46'W	<i>J. curcas</i>	2
Acesso 64	IT10	Ituverava - SP	20°20'S	47°46'W	<i>J. curcas</i>	2
Acesso 65	IT11	Ituverava - SP	20°20'S	47°46'W	<i>J. curcas</i>	1
Acesso 66	IT12	Ituverava - SP	20°20'S	47°46'W	<i>J. curcas</i>	1
Acesso 67	IT13	Ituverava - SP	20°20'S	47°46'W	<i>J. curcas</i>	1
Acesso 68	IT14	Ituverava - SP	20°20'S	47°46'W	<i>J. curcas</i>	1
Acesso 69	IT15	Ituverava - SP	20°20'S	47°46'W	<i>J. curcas</i>	1
Acesso 70	IT16	Ituverava - SP	20°20'S	47°46'W	<i>J. curcas</i>	1
Acesso 71	IT17	Ituverava - SP	20°20'S	47°46'W	<i>J. curcas</i>	1
Acesso 72	JB1	Jaboticabal - SP	21°15'S	48°17'W	<i>J. curcas</i>	1
Acesso 73	CG1	Campina Grande - PB	07°13'S	35°52'W	<i>J. curcas</i>	20
Acesso 74	CG2	Campina Grande - PB	07°13'S	35°52'W	<i>J. curcas</i>	3
Acesso 75	CG3	Campina Grande - PB	07°13'S	35°52'W	<i>J. curcas</i>	1
Acesso 76	RB1	Riachão do Bacamarte - PB	07°14'S	35°39'W	<i>J. curcas</i>	7
Acesso 77	GT1	Galante - PB	07°17'S	35°45'W	<i>J. pohliana</i>	1
Acesso 78	GT3	Galante - PB	07°17'S	35°45'W	<i>J. pohliana</i>	1
Acesso 79	GT4	Galante - PB	07°17'S	35°45'W	<i>J. pohliana</i>	2
Acesso 80	GT5	Galante - PB	07°17'S	35°45'W	<i>J. pohliana</i>	2
Acesso 81	GT6	Galante - PB	07°17'S	35°45'W	<i>J. pohliana</i>	1
Acesso 82	GT7	Galante - PB	07°17'S	35°45'W	<i>J. pohliana</i>	2
Acesso 83	RB2	Riachão do Bacamarte - PB	07°14'S	35°39'W	<i>J. pohliana</i>	1
Acesso 84	GT2	Galante - PB	07°17'S	35°45'W	<i>J. gossypiifolia</i>	4

### 3.6 Extração de DNA genômico

Foram estabelecidos protocolos de extração de DNA genômico eficientes para as espécies *Jatropha curcas* L., *Jatropha pohliana* Muell Arg. e *Jatropha gossypifolia* L., popularmente conhecidas por pinhão-manso, pinhão-bravo e pinhão-roxo, respectivamente. Foram testados cinco protocolos de extração de DNA que utilizam tampão CTAB, todos com modificações de suas metodologias originais: Ferreira e Grattapaglia (1998), Doyle e Doyle (1990), DArT - “Diversity Arrays Technology” (DArT, 2012), Zhang e Stewart (2000) e Elias et al. (2004). Foram coletadas de cinco a sete folhas jovens recém-expandidas de cada planta para a realização dos procedimentos de cada método. Foram utilizadas 10 repetições para cada espécie e protocolo. De modo geral, existem diferenças marcantes entre as três espécies estudadas, e que para fins de exemplificação podem ser facilmente observadas em suas folhas jovens (Figura 1), justificando a necessidade de se identificar o melhor método para cada uma delas.



Fonte: Corrêa (2011)

**Figura 1.** Da esquerda para direita: folhas de pinhão-manso, pinhão-bravo e pinhão-roxo, faces superior (acima) e inferior das folhas (abaixo), representando a diferença morfológica entre as espécies de *Jatropha* estudadas. Jaboticabal, SP.

#### Metodologia Ferreira e Grattapaglia (1998) modificada

O método CTAB (“Cationic Hexadecyl Trimethyl Ammonium Bromide”) propõe que as extrações de DNA ocorram diretamente nos microtubos de 1,5 ml, porém como a folha de pinhão-manso é coriácea com nervuras grosseiras, a maceração foi realizada também em almofariz de porcelana, para fins de comparação, e depois transferida para os microtubos. Posteriormente, foi adicionado nitrogênio líquido aos microtubos. O mesmo procedimento foi repetido para as outras duas espécies, isto é, maceração em microtubos de 1,5 ml e maceração em almofariz, apesar das folhas de pinhão-roxo e pinhão-bravo serem muito mais maleáveis e delicadas que as de pinhão-manso.

Após a maceração, adicionou-se 700 µL do tampão de extração CTAB a 2% (2% de CTAB, EDTA 20 mM, NaCl 1,4 M, Tris-HCl 100 mM pH 8.0 e 2 µl de β-mercaptoetanol por mililitro do tampão, adicionado imediatamente antes do uso). Os microtubos foram homogeneizados em vortex por 10 s e incubados a 65 °C por 30 min em banho-maria. A solução foi centrifugada a 10 000 x g por 3 min e o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo. Posteriormente, adicionou-se 600 µl de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) à solução, a qual foi homogeneizada em vortex por 10 s, as fases foram separadas por centrifugação à velocidade de 16 000 x g, durante 5 min, dispondo-se a fase superior em novo tubo. Adicionou-se 2/3 do volume de isopropanol gelado (-20 °C), as amostras foram suavemente misturadas e mantidas a -20 °C por 30 min. A seguir, nova centrifugação a 4 000 x g por 5 minutos, para formação do “pellet” de DNA, que foi então lavado duas vezes com 1 ml de etanol 70% e uma vez com 1 ml de etanol absoluto. Após a secagem por aproximadamente 12 h, o “pellet” foi ressuspensado em 100 µl de Tampão TE, contendo 10 µg ml<sup>-1</sup> de RNase, e incubado a 37 °C por 30 min para a digestão do RNA e purificação do DNA, e armazenado a -20 °C.

#### Metodologia Doyle e Doyle (1990) modificada

As folhas jovens coletadas foram maceradas com nitrogênio líquido até a obtenção de um fino pó, que foi disposto em microtubos de 1,5 ml contendo 800 µl de tampão de extração CTAB a 2% com modificações (2% de CTAB, EDTA 20 mM, 2% de PVP, NaCl 1,4 M, Tris-HCl 100 mM pH 8,0 e 1% de β-mercaptoetanol); os microtubos foram homogeneizados por inversão durante 10 seg e incubados a 65 °C por 1 h, sendo a solução homogeneizada a cada 15 min. A solução foi centrifugada a 8 000 x g por 5 min, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo, tratado com 4 µl de RNase e incubado a 37 °C por 30 min. Adicionou-se clorofórmio-álcool isoamílico (24:1 v/v) à solução, que foi homogeneizada em vortex e centrifugada a 8 000 x g por 5 min e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo. Esta etapa foi repetida. Isopropanol gelado (-20 °C) foi adicionado ao sobrenadante (70% do volume total do sobrenadante coletado), as amostras foram misturadas e centrifugadas a 8 000 x g por 5 min. O “pellet” de DNA aderido ao tubo foi visualizado. A fase líquida foi removida e o DNA lavado duas vezes com 1 ml de etanol a 70%. A secagem do “pellet” ocorreu por 12 h em temperatura ambiente, sendo posteriormente ressuscitado em 100 µl de tampão TE e armazenado a -20 °C.

Metodologia DArT - “Diversity Arrays Technology” (DArT, 2012)) modificada, baseada no tampão de extração CTAB, proposto por Lemões et al. (2008)

As folhas maceradas até a obtenção de um fino pó foram dispostas em microtubos de 1,5 ml contendo 750 µl de tampão de extração (4,16% de CTAB, EDTA 11 mM, 2% de PVP, NaCl 800 mM, Tris-HCl 600 mM pH 8,0, 0,83% de Sarcosil e Sorbitol 145 mM), os quais foram homogeneizados por inversão durante 5 min e incubados a 65 °C por 45 min. A solução foi homogeneizada por inversão a cada 15 min. Após a incubação, as amostras foram resfriadas em temperatura ambiente e centrifugadas a 10 000 x g por 3 min e 400 µl do sobrenadante foram transferidos para um novo microtubo. Posteriormente, se adicionou clorofórmio-álcool isoamílico (24:1 v/v) à solução, que foi homogeneizada durante 5 min e centrifugada a 8 000 x g por 5 min. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, no qual foi adicionado isopropanol gelado à -20 °C (70% do volume total do



sobrenadante coletado). As amostras foram misturadas por inversão e armazenadas a -20 °C “overnight”. Depois, foram centrifugadas a 10 000 x g por 5 min. Desse modo, o “pellet” de DNA pôde ser visualizado. A fase líquida foi removida e o DNA lavado com 1 ml de etanol a 70%, homogeneizado por inversão e centrifugado por 10 000 x g por 5 min. Repetiu-se essa operação com 1 ml de etanol absoluto. A secagem do “pellet” ocorreu em temperatura ambiente e depois foi ressuscitado em 50 µl de solução TE e 6 µl de RNase por 45 min em banho-maria a 37 °C e armazenado a -20 °C.

#### Metodologia Zhang e Stewart (2000) modificada

Folhas jovens foram também maceradas em nitrogênio líquido até a obtenção de um fino pó, que foi colocado em microtubos de 1,5 ml contendo 600 µl de tampão de extração CTAB a 2%, com modificações (2% de CTAB, EDTA 20 mM, 2% de PVP, NaCl 1,4 M, Tris-HCl 100 mM pH 8,0 e 10% de β-mercaptoetanol, adicionado apenas antes do uso). Houve um acréscimo na concentração de β-mercaptoetanol de 0,2% para 10% no tampão de extração, visando uma maior desnaturação de proteínas. Esta maior concentração já fora testada anteriormente para folhas de pinhão-manso por Lemões et al. (2008), resultando em um material de ótima qualidade. Os microtubos foram misturados por inversão durante 5 min e incubados a 65 °C por 45 min. A solução foi homogeneizada a cada 10 min. Após o período de incubação, adicionou-se clorofórmio-álcool isoamílico (24:1 v/v) à solução, a qual foi homogeneizada por inversão durante 5 min e centrifugada a 7 000 x g por 5 min. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo. Isopropanol gelado (-20 °C) foi adicionado ao sobrenadante (70% do volume total do sobrenadante coletado). As amostras foram misturadas por inversão e armazenadas “overnight” a -20 °C, sendo, então, centrifugadas a 7 000 x g por 5 min. O “pellet” de DNA pôde então ser observado aderido ao fundo do microtubo. A fase líquida foi removida e o DNA lavado com 1 ml de etanol 70%, homogeneizado e centrifugado por 10 000 x g por 5 min. Repetiu-se essa operação com 1 ml de etanol absoluto. A secagem do “pellet” ocorreu por cerca de 12 h em temperatura ambiente, sendo então ressuscitado em

100 µl de tampão TE e 6 µl de RNase por 45 min em banho-maria a 37 °C e armazenado a -20 °C.

Metodologia Elias et al. (2004) modificada, baseada no tampão de extração CTAB, proposto por Dellaporta, Wood e Hicks (1983)

Folhas jovens recém-expandidas foram desidratadas em estufa. Optou-se pela alteração da temperatura e período de desidratação das folhas de 50 °C por 24 h, propostos no método original de Elias et al. (2004), para 60 °C por 72 h, a fim de se facilitar a maceração das folhas, que quando desidratadas seguindo os procedimentos originais, ainda apresentavam água em sua estrutura. As folhas foram, então, maceradas até a obtenção de um fino pó e transferidas para microtubos de 1,5 ml contendo 800 µl de tampão CTAB a 3% (3% de CTAB, EDTA 30 mM, 2% de PVP, NaCl 1,2 M, Tris-HCl 100 mM pH 8,0 e 1% de β-mercaptoetanol). Os tubos foram incubados a 65 °C por 1 h, sendo agitados a cada 15 min. Foram adicionados 500 µl de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1 v/v), misturando por 1 min. As amostras foram centrifugadas a 8 000 x g por 10 min. Após a centrifugação, 500 µl do sobrenadante foram transferidos para um novo tubo com um volume igual de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1 v/v) e 200 µl do tampão de extração. Outra modificação realizada no método original foi a adição de tampão de extração na fase de purificação do DNA com clorofórmio-álcool isoamílico (24:1), buscando-se aumentar a eficiência da extração. Esta solução foi agitada e centrifugada novamente a 8 000 x g por 10 min e 500 µl do sobrenadante foram transferidos para um novo tubo. Foram adicionados 350 µl de isopropanol gelado (-20 °C), e as amostras foram agitadas por inversão. A solução foi centrifugada a 8 000 x g por 10 min e o “pellet” resultante foi deixado para secar por aproximadamente 12 h em temperatura ambiente, depois foi ressuspensão adicionando-se 100 µl de TE e 4 µl de RNase. Os tubos foram incubados a 37 °C por 30 min e então armazenados a -20 °C.

### 3.7 Quantificação de DNA

Posteriormente, as amostras de cada método foram submetidas à corrida em gel de agarose a 1% para se conhecer a qualidade e possível quantidade de material genético resultante das extrações, observando-se o padrão de bandas gerado e confirmando-se, ainda, a ausência de RNA nas amostras, para isso utilizou-se 5 µl de DNA, juntamente com 10 µl de Azul de Bromofenol, totalizando 15 µl de solução para cada amostra aplicada no gel. A eletroforese foi conduzida em tampão TBE 1 x [100 ml de TBE 10 x (Tris base 0,89 M, ácido bórico 0,89 M, EDTA 20 mM pH 8,0 e 900 ml de água ultrapura) corado com 20 µl de brometo de etídeo, a 80 V e 400 mA durante 2 h. A visualização foi feita em transiluminador Gel Doc 2 000 da Bio Rad e digitalizada pelo software Quantity One. Após o estabelecimento do protocolo ideal para cada espécie *Jatropha*, realizou-se a extração de DNA de todos os acessos do Banco, quantificando-se o material genético obtido para cada um, em espectrofotômetro NanoDrop 2 000 da marca ThermoScientific, para se avaliar a pureza por meio da razão 260/280 e concentração do material obtido em ng µl<sup>-1</sup>, a fim de se proceder as devidas diluições para padronização das amostras e utilização na PCR.

### 3.8 Obtenção dos marcadores ISSR

Foram utilizados 100 iniciadores ISSR da coleção nº 9, sintetizada pelo Laboratório de Biotecnologia da Universidade da Columbia Britânica, Canadá, e descritos por Zietkiewicz, Rafalki e Labuda (1994). A PCR (“Polimerase Chain Reaction”) foi realizada para os 84 acessos de *Jatropha*. A reação foi conduzida para um volume final de 25 µl contendo 0,12 µl de *Taq* polimerase (5 unidades µl<sup>-1</sup>), 2,5 µl de tampão de amplificação 10 x (sem Mg<sup>++</sup>), 2,0 µl de MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 1,0 µl de iniciador (10 µM), 0,5 µl de dNTPs (2,5 mM cada), 1,25 µl de DNA (50 ng µl<sup>-1</sup>) e 17,63 µl de água ultrapura. A reação foi conduzida em termociclador da Bio-Rad, seguindo os seguintes parâmetros: 4 min a 94 °C, 35 ciclos de 30 s a 92 °C, 1 min para a temperatura de pareamento do iniciador, 2 min a 72 °C e 7 min a 72 °C para extensão final (SOARES, 2010). As temperaturas de pareamento utilizadas foram

definidas por meio de testes subjacentes de gradiente de temperatura e os resultados definidos para iniciadores que amplificaram estão descritos na Tabela 6. Posteriormente, os produtos de amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose a 3%, corado com brometo de etídio, a 80 V e 400 mA, por aproximadamente 3 h. A visualização foi feita em transiluminador Gel Doc 2 000 Bio-Rad® e visualizada pelo software Quantity One®. Os tamanhos dos fragmentos amplificados foram estimados por comparação visual com o marcador de peso molecular 100 pb.

### **3.9 Análises estatísticas**

#### **3.9.1 Avaliações agromorfológicas**

Inicialmente, as variáveis foram padronizadas para eliminação das unidades de escalas, para então se proceder às análises estatísticas multivariadas para caracteres quantitativos e qualitativos. Todas as análises foram realizadas empregando-se o Software Genes (CRUZ, 2006). As estimativas de dissimilaridades foram geradas utilizando-se o procedimento de distância Euclidiana para caracteres quantitativos e, para caracteres morfológicos qualitativos, foram obtidas a partir da distância de Cole-Rodgers, Smith e Bosland (1997), onde as características, que normalmente não podem ser ordenadas, são classificadas em escalas, podendo assim, ser analisadas como características quantitativas discretas (CRUZ; CARNEIRO, 2006). Com este índice, um determinado valor expressa a porcentagem de coincidências considerando os vários caracteres analisados para cada característica binária e multicategórica, contemplando informações de concordância e discordância de cada classe. Ambos os agrupamentos foram realizados simultaneamente pelo procedimento hierárquico UPGMA (“Unweighted Pair-Group Method Arithmetic Average”) e otimização (Töcher).

#### **3.9.2 Avaliações moleculares**

A partir dos resultados observados nos géis, matrizes binárias indicativas do polimorfismo foram montadas, baseadas na presença (1) e ausência (0) de marcas

(bandas) para cada alelo encontrado. A matriz assim obtida foi utilizada para fins de cálculo de divergência genética e formação de agrupamentos dos genótipos através de diferentes métodos aglomerativos, empregando-se o Software Genes (CRUZ, 2006).

Utilizou-se o coeficiente de dissimilaridade de Jaccard =  $a/a + b + c$ , onde  $a$  é o número de concordâncias do tipo 1-1,  $b$  é o número de discordâncias do tipo 1-0 e  $c$  é o número de discordâncias do tipo 0-1 (CRUZ; CARNEIRO, 2006). Optou-se pelo uso deste coeficiente, pois além de suas propriedades matemáticas, possibilita evidenciar diferenças intraespecíficas e desconsidera a ausência de bandas como sinônimo de similaridade genética.

Após a obtenção das informações sobre o grau de diferença apresentado entre os acessos, foram realizados agrupamentos de acordo com vários métodos aglomerativos, baseando-se em suas dissimilaridades mínimas (vizinho mais próximo), máximas (vizinho mais distante) e pelas médias aritméticas não-ponderadas entre os pares de acessos (UPGMA). Para cada grupo formado foi necessário reconstruir a matriz de dissimilaridade, definindo a distância entre o novo grupo com cada um dos demais, de acordo com o critério de cada método. Os agrupamentos foram representados graficamente sob a forma de dendrogramas.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Análise dos dados agromorfológicos

Observando-se os dados de frequência para caracteres morfológicos qualitativos binários e multicategóricos avaliados para os 84 acessos de *Jatropha* (Tabela 2), nota-se a existência de baixa variabilidade fenotípica, com muitos acessos concentrados em uma mesma classe. Para a realização da análise multivariada, o caráter posição das folhas nos ramos foi removido, uma vez que todos os acessos apresentaram o mesmo padrão, ou seja, folhas alternadas ao longo do pecíolo.

As plantas apresentaram folhas glabras, com coloração roxa quando jovens e verde escuro quando adultas, nervuras foliares verdes e caule ceroso.

Outras características marcantes entre os acessos, também mostrados na Tabela 2, foram a estrutura da planta com ramificações em forma de taça, folhas alternadas ao longo dos ramos, frutos contendo três sementes alongadas, de coloração preta e carúncula não-protuberante. A maioria dos acessos apresentou frutos deiscentes..

O acesso de código GT1 (77) de *J. pohliana*, proveniente de Galante, Paraíba, apresentou folhas glabras, diferindo dos demais acessos de pinhão-bravo desta localidade, que possuem folhas pilosas na face adaxial e abaxial. Do mesmo modo, GT1 apresentou folhas jovens com coloração roxa, enquanto outros acessos de Galante, folhas jovens verdes. O acesso GT2, único da espécie *J. gossypiifolia*, possui estruturas morfológicas muito diferentes dos acessos de *J. curcas* e *J. pohliana*, apresentando folhas pequenas, delicadas, glabras e arroxeadas, mostrando-se um tanto exótico, com características próprias de plantas ornamentais. Acessos das três espécies apresentaram folhas adultas com coloração verde escuro, com exceção de 8 acessos provenientes da Garanhuns - PE e 1 acesso de Mundo Novo - PE, que apresentaram folhas adultas com coloração verde claro. Acessos de pinhão-manso apresentaram, em sua maior parte, folhas com nervuras verdes, enquanto acessos de pinhão-bravo apresentaram nervuras com coloração arroxeadas, com exceção ao acesso RB2 (82), que apresentou nervuras com

coloração vermelha. Todas as plantas do acesso GT2 (84) de pinhão-roxo apresentaram nervuras arroxeadas, com coloração roxa mais intensa em folhas jovens, e roxa mais clara em folhas adultas.

**Tabela 2.** Descrição dos caracteres qualitativos adotados e frequência de ocorrência das categorias nos 84 acessos de *Jatropha* spp. Jaboticabal, SP.

Descritor	Categoria	Frequência relativa (%)	Descritor	Categoria	Frequência relativa (%)
Pilosidade	Pilosa	8	Tipo de ramificação	Trifurcada	14
	Glabra	92		Bifurcada	4
Cerosidade	Cerosa	99		Taça	79
	Não-cerosa	1		Universal	4
Cor das folhas jovens	Verde	7	Padrão das sementes	Cor única	90
	Vermelha	5		Pintada	10
	Roxa	88		Pontuada	0
Cor das folhas adultas	Verde escuro	89	Formato das sementes	Rajada	0
	Verde claro	11		Alongada	92
Cor das nervuras foliares	Verde	93		Arredondada	8
	Roxa	6	Achatada	0	
	Vermelha	1	Tipo de carúncula	Protuberante	10
Posição das folhas no pecíolo	Opostas	0		Não-protuberante	90
	Alternadas	100	Deiscência dos frutos	Deiscentes	92
	Mistas	0		Semi-deiscentes	8
				Indeiscentes	0

As estimativas de dissimilaridades obtidas pelo índice de Cole-Rodgers, Smith e Bosland (1997) a partir dos caracteres agromorfológicos qualitativos possibilitaram identificar como indivíduos mais similares os acessos 1 x 2 e 3 x 4. Por sua vez, os acessos mais divergentes corresponderam aos indivíduos 82 x 48. O agrupamento dos 84 acessos de *Jatropha* spp. foi representado pelo critério de otimização de Töcher (Tabela 3). Verifica-se a formação de 16 pequenos grupos, sendo o maior deles (Grupo 6) formado por 14,29% dos acessos. Os acessos 84 (pinhão-roxo), único com nervuras foliares roxas, e 82 (pinhão-bravo), único com nervuras foliares vermelhas formaram grupos individuais. Os demais acessos dessa espécie foram alocados em outros cinco grupos, juntamente com acessos de pinhão-manso.

Os grupos 1, 2 e 3 basicamente concentraram acessos pertencentes à Garanhuns - PE. Os 17 acessos de pinhão-manso procedentes de Ituverava (55 –

71) foram alocados em diferentes grupos, dos grupos 6 ao 13. Do mesmo modo, os demais acessos de pinhão-bravo foram separados em vários grupos.

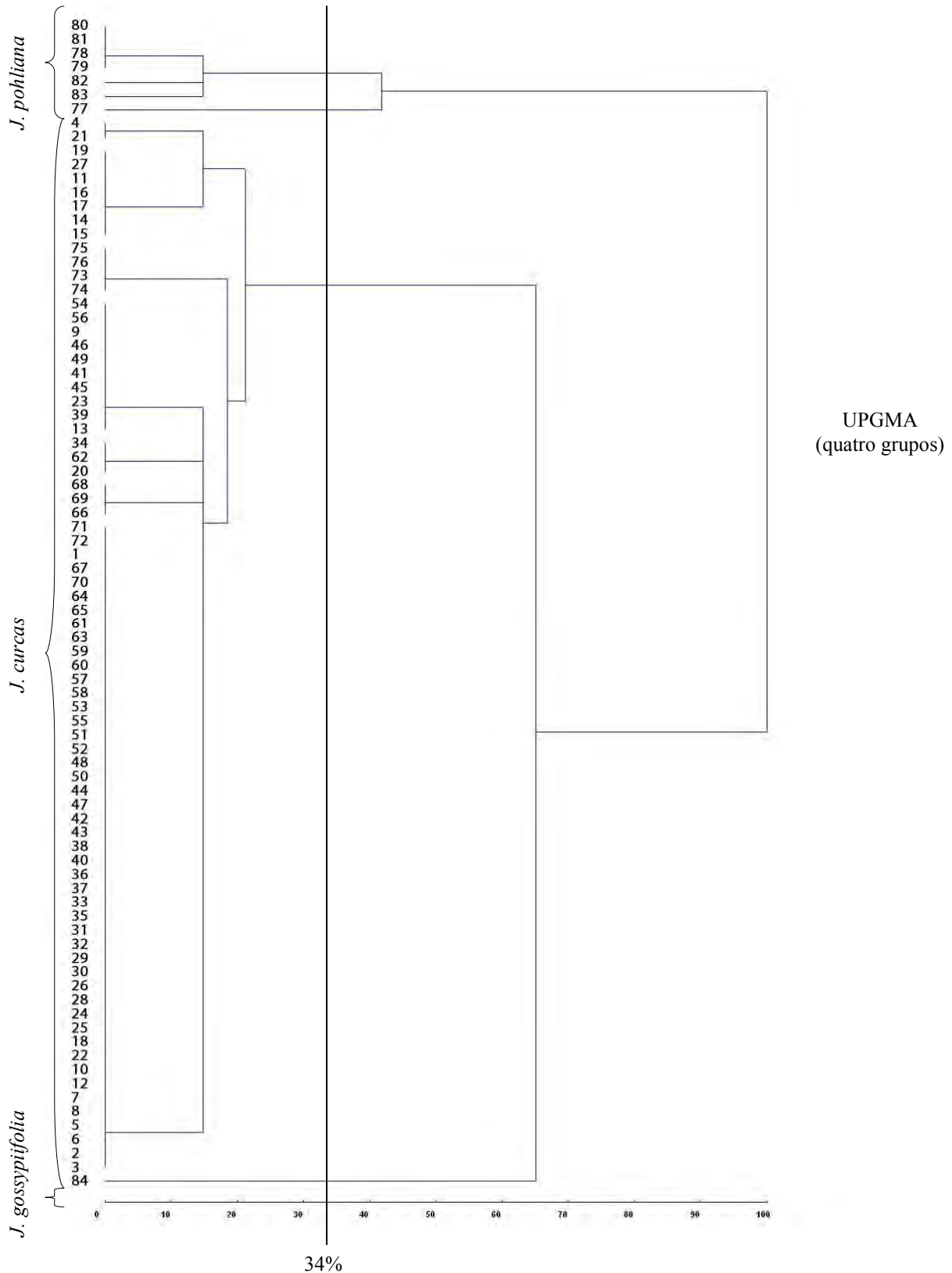
**Tabela 3.** Agrupamentos dos 84 acessos de *Jatropha* spp. pelo método de otimização de Töcher, considerando os caracteres qualitativos avaliados. Jaboticabal, SP.

Grupos	Acessos*
1	1 2 3 4 5 6 12 24
2	5 8 10 14 16 80
3	7 18 20 22 26 28
4	9 11 17 54
5	13 23 30 36 38 46 48
6	15 19 21 29 31 37 51 53 55 65 67 73
7	25 27 57 59 60 66 79
8	32 33 39 41 45 47 71
9	34 40 42 61 75
10	35 44 52 58 62
11	43 49 63 68 72 78
12	50 70 76 81 83
13	56 64 69
14	74 77
15	84
16	82

\* A identificação dos acessos consta na Tabela 1.

Observando-se a Figura 2 e considerando-se os pontos de elevada mudança de nível no dendrograma, adotou-se o critério de 34% aproximadamente de dissimilaridade genética entre grupos, onde ocorre a formação de quatro agrupamentos distintos, número muito inferior ao obtido pelo método de otimização de Töcher. Dois desses grupos foram compostos por acessos de pinhão-bravo, com destaque para o acesso 77 que foi isolado dos demais acessos dessa espécie, 80, 81, 78, 79, 82 e 83, que por sua vez, compuseram um segundo grupo. Ocorreu a formação de um grande grupo, que reuniu os 76 acessos de pinhão-manso. O acesso de pinhão-roxo constituiu o quarto grupo, isolado dos demais acessos de pinhão-manso e pinhão-bravo. Observando-se o grupo formado por acessos de pinhão-manso, percebe-se que acessos de mesma procedência tiveram uma maior proximidade dentro do grupo.





**Figura 2.** Dendrograma originado pelo método UPGMA, a partir das dissimilaridades dos 84 acessos de *Jatropha* spp., baseado em caracteres morfológicos qualitativos. A numeração dos acessos corresponde ao especificado na Tabela 1. Jaboticabal, SP.

Analisando-se valores máximos, mínimos, médias e desvios padrões para caracteres quantitativos (Tabela 4), observa-se que houve grande variabilidade entre os acessos para os seis caracteres avaliados. O caráter número de lóbulos oscilou entre três e sete lóbulos. Para os acessos de pinhão-manso, tal variação pôde ser observada também dentro de uma mesma planta, desse modo, adotou-se como critério dez folhas adultas do terço mediano da planta. Já para os acessos de pinhão-bravo, não houve essa variação, pois todas as plantas apresentaram folhas serrilhadas, carnosas e com cinco lóbulos. O acesso GT2 (84), único de *J. gossypifolia*, apresentou folhas recortadas com três lóbulos bem definidos e somente ele, dentre os 84 acessos estudados, não apresentou cerosidade visível no caule. A altura das plantas e diâmetro de caule foi mais variável entre acessos interespecíficos do que intraespecíficos, mantendo-se mais regulares entre acessos de *J. curcas*, estando a maior parte desses acessos acima de 100,00 cm de altura, podendo atingir até 230,00 cm. Já o diâmetro médio do caule esteve em torno de 5,00 cm. Os acessos procedentes de Garanhuns - PE mostraram-se mais altos que os demais de *J. curcas*. Acessos de *J. pohliana* apresentaram altura média superior aos acessos das demais espécies estudadas, muitas vezes próxima a 200,00 cm de altura. Porém, o diâmetro do caule de suas plantas manteve-se próximo à média dos acessos de pinhão-manso. As plantas do acesso GT2 (84), pinhão-roxo, são visivelmente mais baixas que as dos demais acessos, no entanto, a medida do diâmetro de seu caule assemelha-se às de *J. curcas* e *J. pohliana*. Quanto ao ciclo de maturação, nota-se um mínimo de 240 e máximo de 342 dias. Para sementes, ocorreu oscilação nos valores de comprimento e largura, com valores mínimos de 0,82 e 0,41 cm, médios de 1,76 e 1,08 cm e máximos de 1,93 e 1,24 cm.

**Tabela 4.** Valores mínimos, médios, máximos e desvios padrões relativos aos caracteres quantitativos utilizados na avaliação dos 84 acessos de *Jatropha* spp. Jaboticabal, SP.

Acessos	Caracteres quantitativos	Valores			Desvio padrão
		Mínimo	Médio	Máximo	
<i>J. curcas</i>	Número de lóbulos foliares	5,00	5,67	7,00	0,71
	Altura da planta (cm)	74,80	112,64	188,00	23,11
	Diâmetro do caule (cm)	4,42	5,36	6,18	0,46
	Maturação dos frutos (dias)	232,00	238,00	246,00	2,55
	Comprimento da semente (cm)	1,66	1,82	1,93	0,05
	Largura da semente (cm)	0,92	1,10	1,24	0,06
<i>J. pohliana</i>	Número de lóbulos foliares	0,71	5,54	7,00	0,89
	Altura da planta (cm)	112,00	114,57	230,00	40,81
	Diâmetro do caule (cm)	4,64	5,29	6,18	0,23
	Maturação dos frutos (dias)	232,00	234,11	246,00	1,53
	Comprimento da semente (cm)	1,12	1,75	1,93	0,08
	Largura da semente (cm)	0,41	1,07	1,24	0,23
<i>J. gossypiifolia</i>	Número de lóbulos foliares	3,00	3,00	3,00	0,00
	Altura da planta (cm)	101,00	101,00	101,00	0,00
	Diâmetro do caule (cm)	4,18	4,18	4,18	0,00
	Maturação dos frutos (dias)	226,00	226,00	226,00	0,00
	Comprimento da semente (cm)	0,82	0,82	0,82	0,00
	Largura da semente (cm)	0,50	0,50	0,50	0,00
<i>Jatropha</i> spp.	Número de lóbulos foliares	3,00	6,00	7,00	0,75
	Altura da planta (cm)	74,80	117,05	230,00	28,91
	Diâmetro do caule (cm)	4,18	5,31	6,18	0,47
	Maturação dos frutos (dias)	240,00	291,00	342,00	22,94
	Comprimento da semente (cm)	0,82	1,76	1,93	0,19
	Largura da semente (cm)	0,41	1,08	1,24	0,12

Na Tabela 5 está apresentado o agrupamento pelo método de Töcher para dados quantitativos. Constata-se a formação de um grande grupo (Grupo 1), formado por 92,86% dos acessos, que reúne todos os acessos de pinhão-manso (1-76) e mais três acessos de pinhão-bravo (77, 80 e 82), e mais dois grupos formados pelos acessos 79 e 81 de pinhão-bravo (Grupo 2) e acessos 83 e 84 de pinhão-bravo e pinhão-roxo, respectivamente (Grupo 3), ambos oriundos do estado da Paraíba.

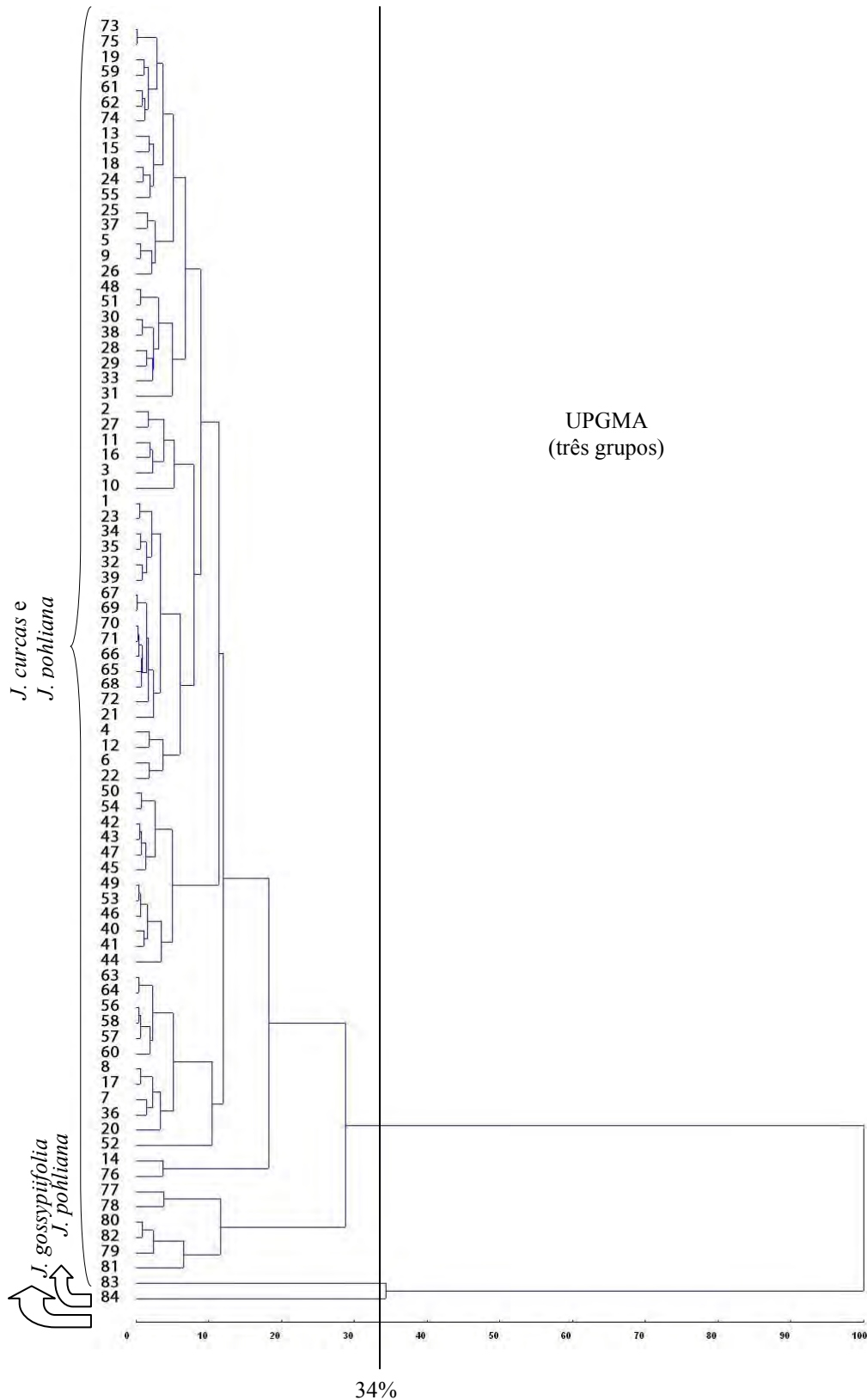
**Tabela 5.** Agrupamentos dos 84 acessos de *Jatropha* spp. pelo método de otimização de Töcher, considerando os caracteres quantitativos avaliados. Jaboticabal, SP.

Grupos	Acessos													
	73	75	74	62	61	59	19	38	15	13	55	18		
	24	34	9	11	5	26	25	57	37	35	27	30	33	
	39	1	32	42	48	31	65	68	71	69	66	23		
1	70	67	21	20	22	60	43	36	58	56	4	12		
	16	40	7	8	72	17	54	6	2	3	47	29	50	28
	51	53	64	63	45	10	44	41	49	46	14	78		
						76	52	77	82	80				
2								79	81					
3								83	84					

\* A identificação dos acessos consta na Tabela 1.

Observando-se o dendrograma formado com base em caracteres quantitativos (Figura 3) e tomando-se uma pressão de seleção também em torno de 34%, a fim de se reduzir a subjetividade entre análises, constata-se a formação de 3 grupos distintos, sendo que apenas os acessos 84 (*J. gossypiifolia*) e 83 (*J. pohliana*) formaram grupos isolados. O acesso 83 de *J. pohliana*, procedente do estado da Paraíba, região de Riachão do Bacamarte, foi separado dos demais acessos dessa espécie principalmente pelo tamanho reduzido de suas sementes, tanto em comprimento (média de 1,12 cm), quanto em largura (média de 0,41 cm), valores estes muito semelhantes aos observados para sementes de *J. gossypiifolia*, 0,82 cm e 0,50 cm, respectivamente para médias de comprimento e largura.

Os demais acessos de pinhão-bravo (77, 78, 79, 80, 81 e 82) foram alocados juntamente com os 76 acessos de pinhão-manso formando apenas um grupo. Porém, nota-se que os acessos de *J. pohliana* permaneceram unidos na extremidade inferior do dendrograma e o mesmo ocorreu com os acessos de *J. curcas*, que foram todos alocados na extremidade superior do agrupamento, sempre vizinhos entre si, ou seja, não houve mistura de acessos de diferentes espécies dentro do grupo.



**Figura 3.** Dendrograma originado pelo método UPGMA, a partir das dissimilaridades dos 84 acessos de *Jatropha* spp., baseado em caracteres morfológicos quantitativos. A numeração dos acessos corresponde ao especificado na Tabela 1. Jaboticabal, SP.

## 4.2 Otimização dos protocolos de extração de DNA

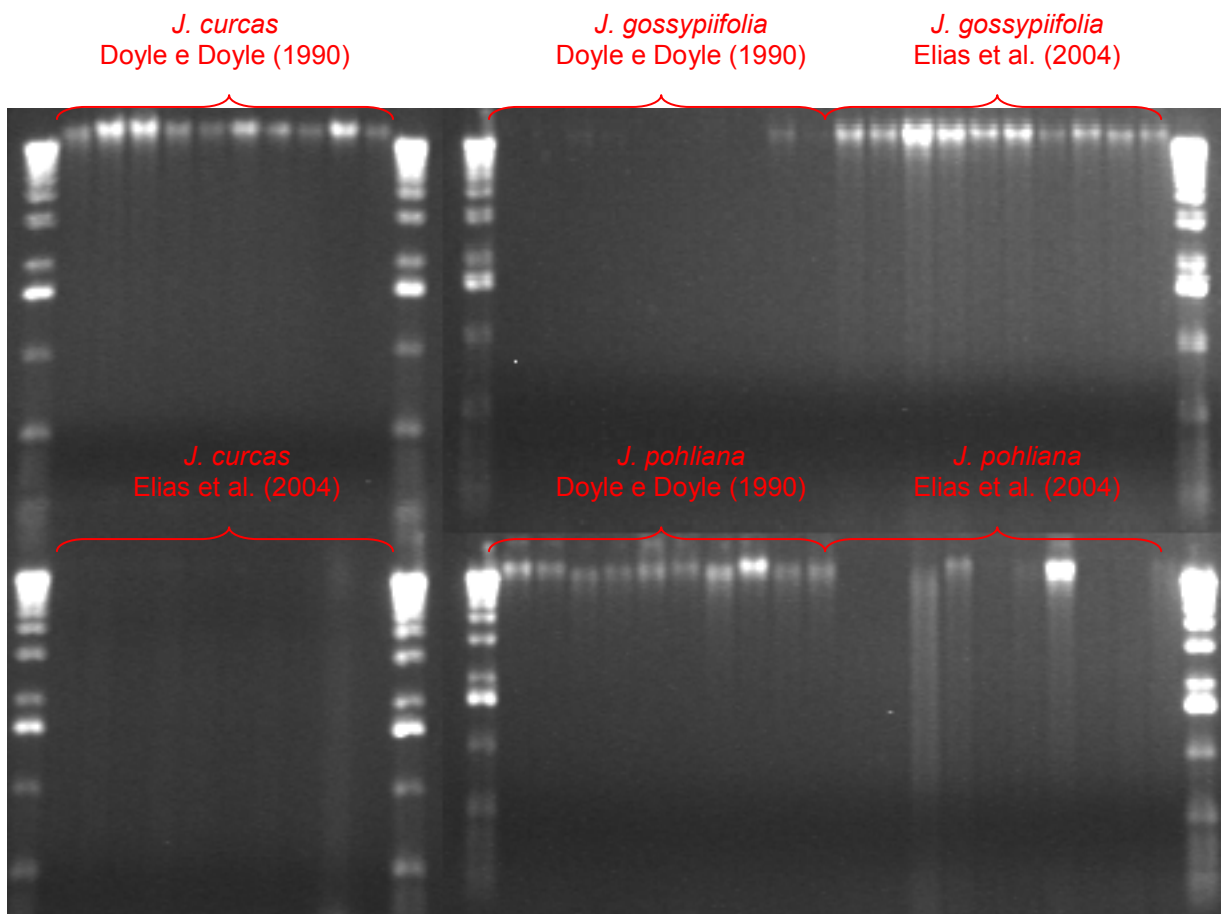
Para cada acesso foi extraído o DNA genômico de folhas, sendo que a metodologia utilizada variou conforme a espécie. Para pinhão-mansinho optou-se pelo protocolo proposto por Doyle e Doyle (1990). Devido às singularidades dos acessos de pinhão-bravo e pinhão-roxo, a extração de DNA para essas espécies seguiu a metodologia proposta por Elias et al. (2004) com modificações, baseada no tampão de extração CTAB, metodologia Dellaporta, Wood e Hicks (1983), em que as folhas passam por um período de desidratação em estufa à 60 °C por 72 h, para só então, serem maceradas em almofariz de porcelana sem o uso de nitrogênio líquido. A temperatura e período de desidratação das folhas propostos para mandioca no método original de Elias et al. (2004) foram aumentados a fim de se facilitar a maceração, devido à característica “carnosa” das folhas de pinhão-bravo e pinhão-roxo.

A Figura 4 mostra os perfis de bandas de DNA obtidos para as três espécies, dos dois métodos de extração testados que apresentaram os melhores resultados. Os protocolos foram repetidos diversas vezes e sofreram algumas alterações a fim de se otimizar a extração para cada uma das espécies. Em um primeiro momento a extração de DNA foi testada diretamente em tubos de 1,5 ml, utilizando-se nitrogênio líquido, porém observou-se que diferentemente da extração realizada em almofariz, não era possível se macerar toda a folha, o que comprometia a qualidade e quantidade do material extraído e, no caso do pinhão-mansinho, cujas folhas jovens são bastante coriáceas, com nervuras muito grossas, a maceração era ainda mais dificultada. Optou-se, portanto, pela extração em almofariz para as três espécies.

Os resultados obtidos para as metodologias de Ferreira e Grattapaglia (1998), DArT - “Diversity Arrays Technology” (DArT, 2012) e Zhang e Stewart (2000) com modificações não foram bons para nenhuma das espécies, o material obtido foi de baixa qualidade, o que impossibilitou a observação do DNA nos géis de agarose. Além disso, para a metodologia de Ferreira e Grattapaglia (1998) houve oxidação do material final obtido para as três espécies, o que talvez tenha ocorrido devido à falta de PVP na composição do tampão CTAB indicado para este protocolo.

As metodologias Doyle e Doyle (1990) modificada e Elias et al. (2004) modificada, mostraram resultados promissores para *Jatropha* spp. (Figura 4). Ambas as metodologias sofreram modificações, como a repetição da etapa de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1), o que foi importante para aumentar a purificação do DNA. Outra modificação em Elias et al. (2004) foi a adição de 200 µl de tampão CTAB sem β-mercaptoethanol.

O protocolo proposto por Doyle e Doyle (1990) gerou os melhores resultados para pinhão-manso e pinhão-bravo (Figura 4) e foi considerado um método prático por necessitar de menos centrifugações e menos reagentes.



**Figura 4.** Quantificação de DNA em gel de agarose a 1% de dez amostras de *Jatropha curcas* (pinhão-manso), *Jatropha gossypifolia* (pinhão-roxo) e *Jatropha pohliana* (pinhão-bravo) mostrando as metodologias de Doyle e Doyle (1990) e Elias et al. (2004), ambas com modificações, mais Ladder de 1 Kb nas extremidades. Jaboticabal, SP.

A metodologia que mostrou os melhores resultados para pinhão-roxo foi a de Elias et al. (2004) (Figura 4), caracterizada pela não utilização de nitrogênio líquido

no momento da extração e sim pela desidratação das folhas em estufa à 60 °C por 72 h, o que facilita a quebra e maceração em almofariz. O uso desta técnica, contrariamente às demais, possibilita a obtenção de um pó vegetal mais seco e mais fino, livre de oxidações. Além disso, a maceração torna-se muito mais rápida e o custo do processo, reduzido, uma vez que não utiliza nitrogênio líquido.

### **4.3 Análise dos dados moleculares**

Dos 100 iniciadores ISSR utilizados, 43 foram selecionados por apresentarem quantidade, qualidade e reprodutibilidade de bandas amplificadas. Todos os 43 iniciadores apresentaram polimorfismo para os 84 acessos estudados. Um total de 451 bandas foram produzidas (Tabela 6), das quais 185 foram polimórficas, revelando um nível intermediário de polimorfismo, 39,6%, entre os acessos.

O número de bandas produzidas por iniciador variou de cinco (ISSR 840) a 21 (ISSR 834), com média de 10,5 bandas por iniciador (Tabela 6). A taxa de polimorfismo por iniciador foi de aproximadamente 4,3 bandas, com uma variação de 1 (ISSR 840) a 15 bandas polimórficas (ISSR 834). O tamanho dos fragmentos amplificados variou de 150 a 1900 pb, aproximadamente.

Um exemplo do padrão de banda e polimorfismo detectado para o iniciador ISSR 812 aplicado nos 84 acessos de *Jatropha* spp. está apresentado na Figura 5.



**Tabela 6.** Sequência de bases nitrogenadas, temperatura de pareamento (Tp), número de total fragmentos (NTF), número de fragmentos polimórficos (NFP) e porcentagem de polimorfismo (P%) obtidos nas análises dos 43 marcadores ISSR em 84 acessos de *Jatropha* spp. Jaboticabal, SP.

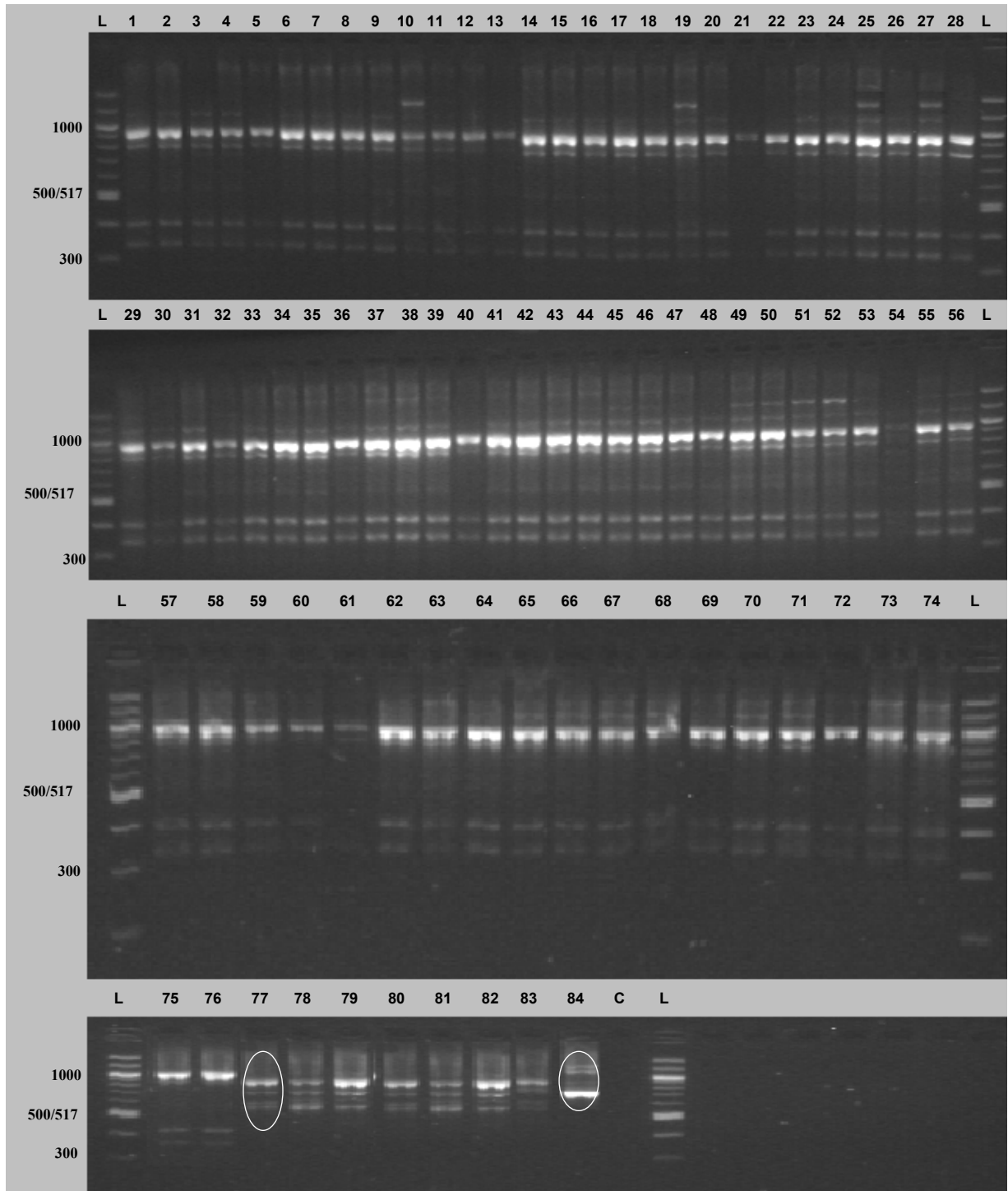
Iniciador	Sequência (5' 3') <sup>(1)</sup>	Tp (°C)	NTF	NFP	P%
807	AGA GAG AGA GAG AGA GT	49,8	9	4	44,4
808	AGA GAG AGA GAG AGA GC	56,0	9	4	44,4
809	AGA GAG AGA GAG AGA GG	51,5	11	5	45,5
810	GAG AGA GAG AGA GAG AT	55,0	17	9	52,9
811	GAG AGA GAG AGA GAG AC	55,0	17	8	47,1
812	GAG AGA GAG AGA GAG AA	50,0	13	7	53,8
813	CTC TCT CTC TCT CTC TT	55,0	7	4	57,1
815	CTC TCT CTC TCT CTC TG	55,0	9	3	33,3
817	CAC ACA CAC ACA CAC AA	55,0	15	5	33,3
818	CAC ACA CAC ACA CAC AG	55,0	14	2	14,3
819	GTG TGT GTG TGT GTG TA	55,0	10	6	60,0
821	GTG TGT GTG TGT GTG TT	55,0	11	7	63,6
822	TCT CTC TCT CTC TCT CA	55,0	8	4	50,0
823	TCT CTC TCT CTC TCT CC	55,0	14	8	57,1
824	TCT CTC TCT CTC TCT CG	55,0	12	9	75,0
825	ACA CAC ACA CAC ACA CT	55,0	12	4	33,3
826	ACA CAC ACA CAC ACA CC	55,0	15	7	46,7
827	ACA CAC ACA CAC ACA CG	52,0	17	7	41,2
828	TGT GTG TGT GTG TGT GA	55,0	8	4	50,0
829	TGT GTG TGT GTG TGT GC	50,0	10	6	60,0
830	TGT GTG TGT GTG TGT GG	52,0	9	6	66,7
834	AGA GAG AGA GAG AGA GYT	52,5	21	15	71,4
835	AGA GAG AGA GAG AGA GYC	53,9	9	4	44,4
836	AGA GAG AGA GAG AGA GYA	53,7	9	3	33,3
840	GAG AGA GAG AGA GAG AYT	54,2	5	1	20,0
841	GAG AGA GAG AGA GAG AYC	55,0	8	4	50,0
842	GAG AGA GAG AGA GAG AYG	55,0	8	1	12,5
847	CAC ACA CAC ACA CAC ARC	53,3	10	4	40,0
850	GTG TGT GTG TGT GTG TYC	55,0	6	2	33,3
853	TCT CTC TCT CTC TCT CRT	55,0	7	1	14,3
858	TGT GTG TGT GTG TGT GRT	55,0	9	4	44,4
860	TGT GTG TGT GTG TGT GRA	55,0	10	4	40,0
863	AGT AGT AGT AGT AGT AGT	55,0	8	1	12,5
864	ATG ATG ATG ATG ATG ATG	55,0	10	2	20,0
866	CTC CTC CTC CTC CTC CTC	55,0	13	1	7,7
867	GGC GGC GGC GGC GGC GGC	50,0	13	2	15,4
876	GAT AGA TAG ACA GAC A	55,0	9	2	22,2
880	GGA GAG GAG AGG AGA	55,0	9	1	11,1
881	GGG TGG GGT GGG GTG	55,0	7	3	42,9
884	HBH AGA GAG AGA GAG AG	55,0	7	3	42,9
887	DVD TCT CTC TCT CTC TC	55,0	7	2	28,6
889	DBD ACA CAC ACA CAC AC	53,6	11	3	27,3
891	HVH TGT GTG TGT GTG TG	50,4	8	3	37,5
Total			451	185	
Média		54,0	10,5	4,3	39,6

<sup>(1)</sup>B, D, H, R, V e Y significam oligonucleotídeos degenerados: B = (T, C, G); D = (A, G, T); H = (A, T, C); R = (A, G); V = (A, C, G) e Y = (C, T).

As médias das dissimilaridades genéticas entre acessos de cada espécie e entre espécies foram altas (Tabela 7). A espécie *J. gossypifolia*, por estar representada apenas pelo acesso 84, apresentou valor nulo para variação intraespecífica, conforme esperado. A espécie *J. curcas*, por sua vez, mesmo estando representado por mais acessos que as demais, apresentou baixa variação intraespecífica. O menor valor estimado de variação interespecífica ocorreu entre *J. pohliana* e *J. gossypifolia* (10,54%) e o maior, entre *J. pohliana* e *J. curcas* (12,96%), aproximando-se muito do valor encontrado entre *J. gossypifolia* e *J. curcas* (12,68%).

**Tabela 7.** Médias das dissimilaridades genéticas (%) estimadas por meio de iniciadores moleculares ISSR, adotando-se o complemento aritmético do coeficiente de Jaccard, para três espécies do gênero *Jatropha*. Jaboticabal, SP.

	<i>J. curcas</i>	<i>J. pohliana</i>	<i>J. gossypifolia</i>
<i>J. curcas</i>	2,09	12,96	12,68
<i>J. pohliana</i>	-	2,56	10,54
<i>J. gossypifolia</i>	-	-	0,00

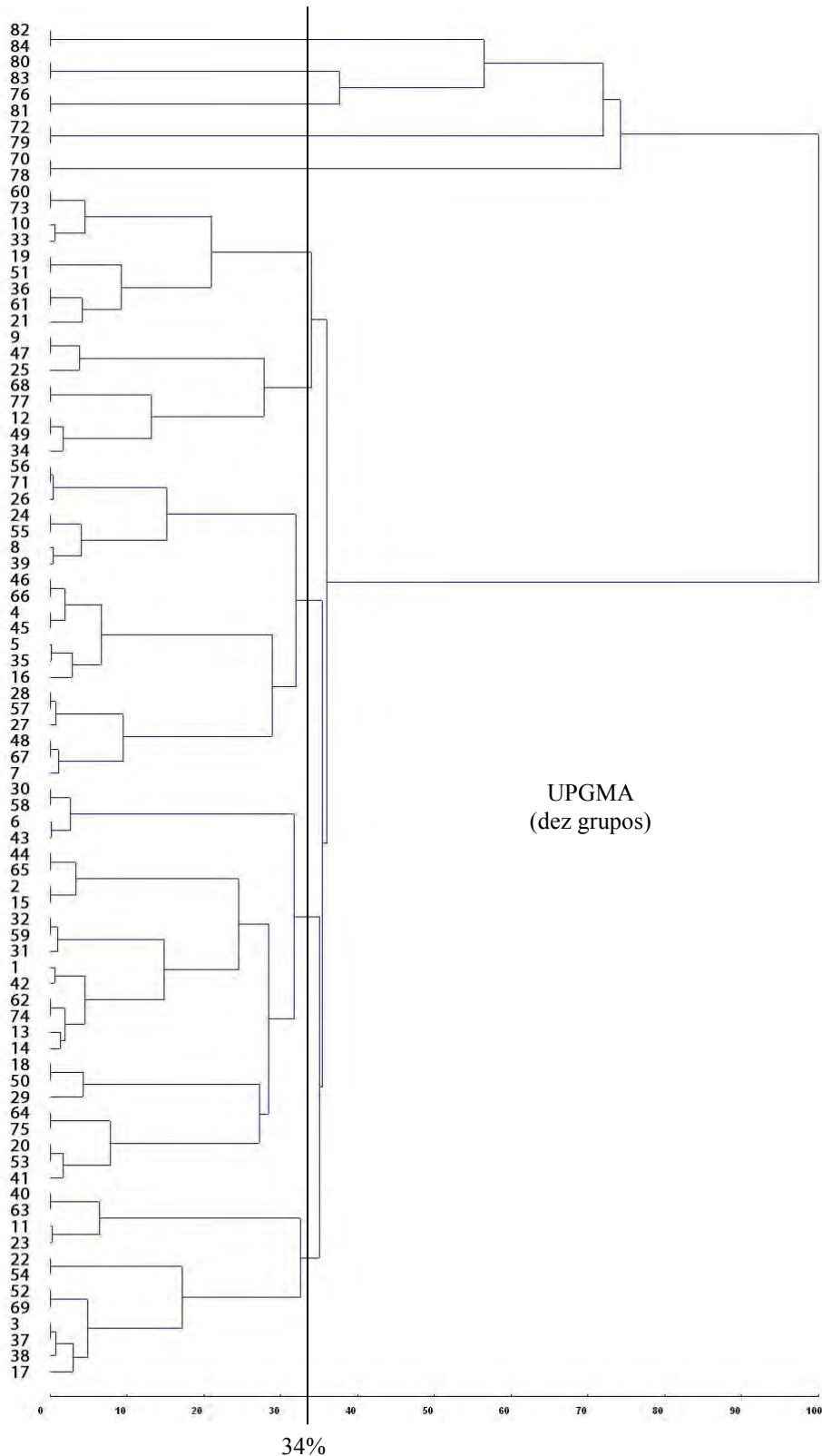


**Figura 5.** Padrão de amplificação do iniciador ISSR 812 em 84 genótipos de *Jatropha* spp. obtidos em gel de agarose a 3% (L: padrão de peso molecular 100 pb; C: controle negativo). Nas colunas, a numeração de 1 a 84 está de acordo com a identificação dos acessos listados na Tabela 1. Jaboticabal, SP.

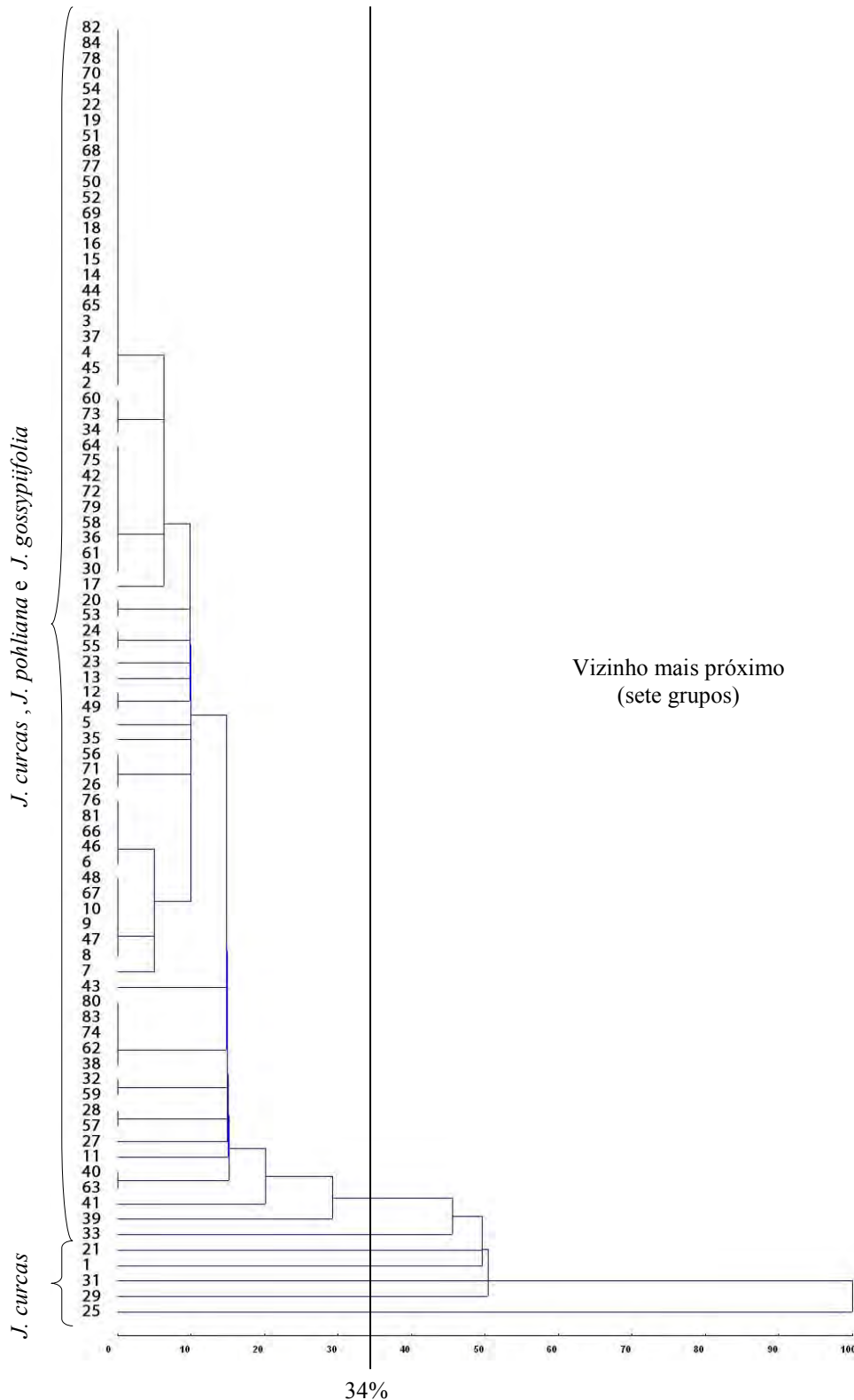
Observando-se as Figuras 6, 7 e 8 que evidenciam os resultados da hierarquização para os 84 acessos do gênero *Jatropha* pelos métodos de UPGMA, vizinho mais próximo e vizinho mais distante, respectivamente a partir do complemento aritmético do coeficiente de Jaccard (CRUZ; CARNEIRO, 2006), nota-se as diferenças na composição dos grupos de acessos formados.

Em uma primeira análise observa-se que o método do vizinho mais distante, mostrou-se estruturalmente mais distinto que os demais. No entanto, os três métodos apresentaram diferentes níveis de agrupamentos dos acessos. Adotando-se o mesmo percentual de dissimilaridade genética utilizado para caracteres morfológicos, em torno de 34%, constata-se a formação de diferentes agrupamentos. Pelo método de UPGMA, houve a formação de dez grupos distintos (Figura 6), um número intermediário aos demais métodos, sendo que de um modo geral, os acessos de pinhão-manso formaram cinco grupos distintos e os acessos de pinhão-bravo e pinhão-roxo compuseram os outros cinco grupos restantes. Com exceção ao acesso de pinhão-roxo (84) que fora alocado juntamente a um acesso de pinhão-bravo (82), o acesso de pinhão-bravo (77) que ficou alocado em um mesmo grupo constituído apenas por acessos de pinhão-manso e também pelos acessos 70, 72 e 76 de pinhão-manso que foram alocados em grupos distintos contendo acessos de pinhão-bravo (78, 79 e 81 respectivamente), nota-se uma maior divergência entre acessos interespecíficos do que intraespecíficos.

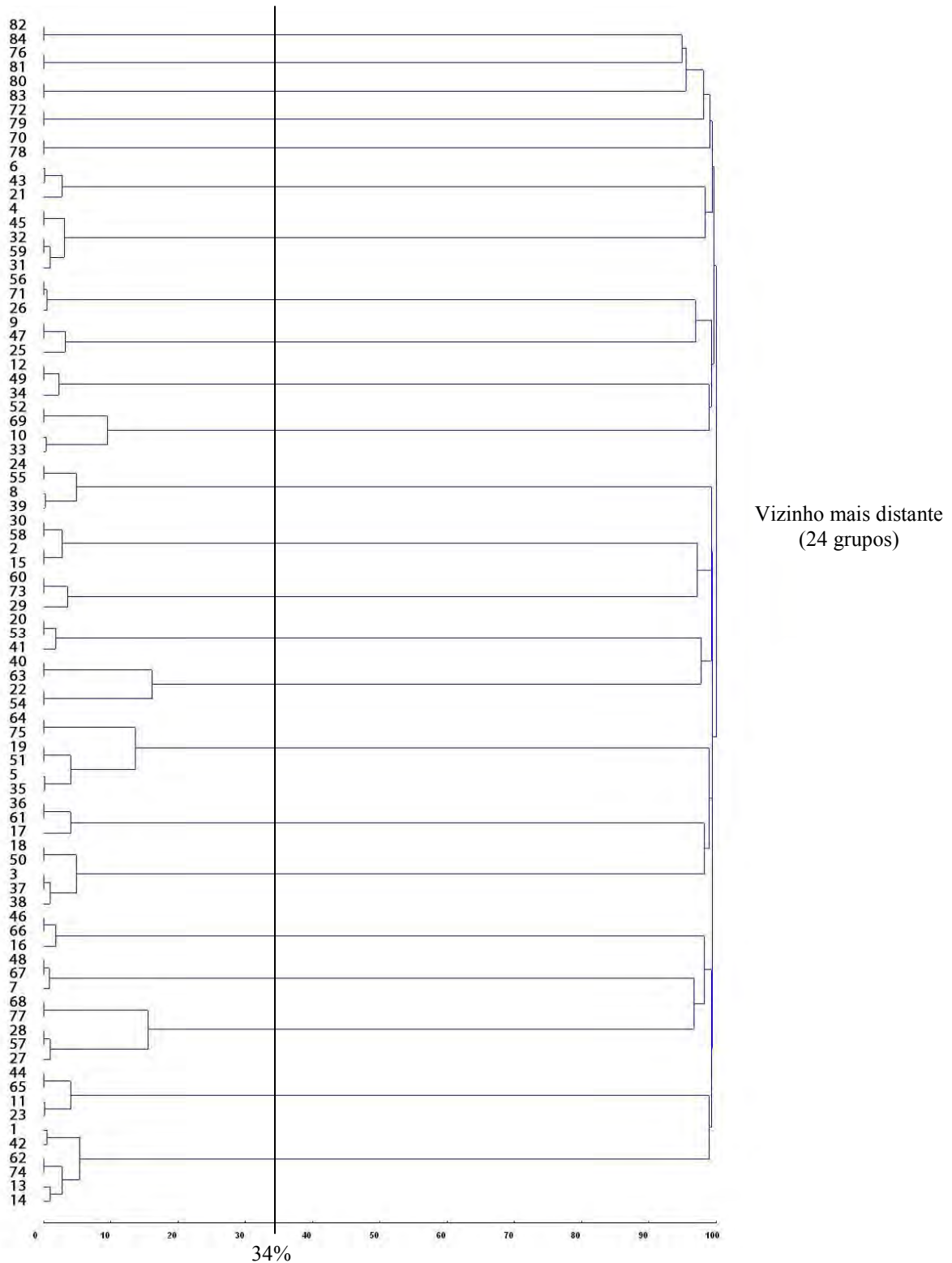
No método do vizinho mais próximo (Figura 7), nota-se a formação de um menor número de grupos, sendo que dos sete aglomerados formados, seis são compostos por acessos isolados de pinhão-manso (1, 11, 21, 25, 29 e 33). O sétimo e último grupo é composto pelos demais acessos de pinhão-manso, acessos de pinhão-bravo e pinhão-roxo, o que caracteriza, aproximadamente, 93% dos acessos



**Figura 6.** Dendrograma obtido pelo critério de agrupamento de UPGMA construído a partir do complemento aritmético do coeficiente de Jaccard entre 84 acessos de *Jatropha* spp., baseado em marcadores moleculares ISSR. A numeração dos acessos corresponde ao especificado na Tabela 1. Jaboticabal, SP.



**Figura 7.** Dendrograma obtido pelo critério de agrupamento do vizinho mais próximo construído a partir do complemento aritmético do coeficiente de Jaccard entre 84 acessos de *Jatropha* spp., baseado em marcadores moleculares ISSR. A numeração dos acessos corresponde ao especificado na Tabela 1. Jaboticabal, SP.



**Figura 8.** Dendrograma obtido pelo critério de agrupamento do vizinho mais distante construído a partir do complemento aritmético do coeficiente de Jaccard entre 84 acessos de *Jatropha* spp., baseado em marcadores moleculares ISSR. A numeração dos acessos corresponde ao especificado na Tabela 1. Jaboticabal, SP.

estudados. Para o método do vizinho mais distante ocorreu a formação de 24 grupos distintos (Figura 8), sendo que o nível de dissimilaridade observada entre grupos foi, de um modo geral, mais homogênea e mais elevada do que os outros dois métodos de agrupamento realizados.



## 5. DISCUSSÃO

Foram observados entre todos os acessos, caracteres qualitativos bastante similares, mesmo entre espécies diferentes, como folhas alternadas e espiraladas ao longo dos pecíolos. Vasconcelos et al. (2010) estudando a fitoaloxia de acessos de pinhão-manso procedentes dos estados da Bahia e Paraíba encontraram resultados similares aos observados nesse trabalho. Os mesmos autores caracterizaram, ainda, folhas de pinhão-manso como sendo de coloração verde, quando adultas e glabras, porém quando jovens, as folhas apresentavam coloração vinácea, indicando inatividade fotossintética, resultados estes, também observados nos acessos de pinhão-manso deste estudo. Melo et al. (2007), contrariamente, caracterizaram acessos com folhas pilosas na face adaxial, indicando que existe variabilidade intraespecífica em *J. curcas*.

Quanto à estrutura de ramificações, observou-se uma predominância da estrutura de taça em 79% dos acessos de *Jatropha* spp., o que corresponderia ao caule do tipo monopodial, presente em 57 acessos de pinhão-manso estudados por Vasconcelos et al. (2010).

Trabalhos anteriores corroboram a classificação encontrada para coloração de nervuras foliares. Melo et al. (2007) ao caracterizar morfologicamente acessos de *J. curcas* do banco ativo de germoplasma da Universidade Federal de Sergipe, verificaram que dos 15 acessos estudados, todos possuíam nervuras de coloração verde. No entanto, Vasconcelos et al. (2010) e Avelar et al. (2008) observaram nervuras foliares com saliências esbranquiçadas na face abaxial de acessos de pinhão-manso.

Muitas características apresentadas pelos frutos de *J. curcas*, *J. pohliana* e *J. gossypifolia* nesse estudo foram verificadas também em frutos de *J. elliptica* (AÑEZ et al., 2005), outra espécie do gênero, como o mecanismo de propulsão de sementes explosivo. A deiscência marcante observada nos frutos de *J. curcas*, *J. pohliana* e *J. gossypifolia* também está presente em frutos de outros gêneros de Euphorbiaceae. Barroso et al. (1999) ressaltaram que todas essas espécies estão relacionadas entre si e devem ter se originado de um ancestral comum.

Nesse estudo, a altura das plantas entre acessos de *J. curcas* e *J. pohliana*, de um modo geral, foi elevada. Nesse caso torna-se interessante a seleção de genótipos com menor porte para facilitar as operações de colheita (DIAS et al., 2007). Estudo realizado com 57 acessos de pinhão-manso procedentes de Petrolina - BA e Columbia - PB, denotaram altura média de 164,00 cm nos acessos do primeiro grupo e 190,00 cm no segundo grupo (VASCONCELOS et al., 2010), confirmando os resultados observados nos acessos desse trabalho.

Estudos de contribuição de caracteres para diversidade são importantes para selecionar aqueles que melhor discriminem acessos e descartar outros que contribuam pouco para a discriminação de genótipos (CRUZ; REGAZZI; CARNEIRO, 2012).

Houve grande variabilidade entre acessos para o caráter número de dias para maturação de frutos, o que pode ser justificado por se tratarem de espécies alógamas, dependentes de insetos polinizadores, que, por sua vez, podem estar distribuídos no ambiente de forma irregular ou insuficiente. Tais diferenças podem ser explicadas, ainda, pelas divergências genéticas que ocorrem naturalmente entre acessos de determinadas espécies e procedências. Observou-se, também, uma grande heterogeneidade de frutificação dentro de uma mesma planta, o que provavelmente ocorreu pelos mesmos motivos citados anteriormente.

Valores inferiores aos encontrados para comprimento e largura de sementes neste estudo, já foram observados anteriormente por Añez et al. (2005) para sementes de *J. elliptica*, tendo em média, 0,82 cm de comprimento e 0,43 cm de largura. No entanto, sementes de *J. gossypifolia* foram as menores dentre as três espécies estudadas, com valores médios de 0,82 e 0,50 cm, respectivamente para comprimento e largura, muito próximos aos valores encontrados por Añez et al. (2005) para *J. elliptica*.

A elevada variabilidade observada entre acessos para os caracteres número de lóbulos foliares, altura de plantas, diâmetro de caule, ciclo de maturação, comprimento e largura de semente, certamente, servirão de base para futuros estudos. Já para os demais caracteres avaliados, neste caso os qualitativos, houve também variabilidade, o que possibilitou a separação dos acessos em muitos grupos, superior até mesmo aos caracteres quantitativos. No entanto, nota-se que

muitos acessos foram colocados dentro de uma mesma categoria de classificação, por exemplo, 92% dos acessos apresentaram folhas glabras e apenas 8% folhas pilosas. Ao se utilizar um maior número de caracteres do tipo qualitativo, como ocorreu neste estudo, aumentam-se as chances de se obter variabilidade entre acessos. Observando-se os resultados para cada caráter qualitativo individualmente, percebe-se uma baixa variação entre acessos, o que pode ser explicado pela estreita base genética das plantas constituintes do banco de germoplasma em estudo e ainda pela natureza monogênica desses caracteres. O mesmo pôde ser observado nos agrupamentos realizados pelo critério de otimização de Töcher para ambos os tipos de caracteres, que mostram a formação de um maior número de grupos para caracteres morfológicos qualitativos.

Houve congruência entre alguns grupos formados nas análises de agrupamentos por UPGMA para caracteres qualitativos e quantitativos. Em ambas nota-se a separação entre grupos contendo grande parte de acessos pertencentes a uma mesma espécie, evidenciando a baixa variabilidade intraespecífica dessas espécies de *Jatropha*, em oposição à diversidade interespecífica encontrada. A otimização por Töcher proporcionou uma separação bastante semelhante à por UPGMA para ambos os tipos de caracteres avaliados.

Analisando-se os protocolos de extração de DNA testados, nota-se que a metodologia adotada variou para cada espécie estudada, sendo esta variação altamente dependente de características estruturais e fisiológicas inerentes a cada uma delas. As folhas jovens de pinhão-manso mostram-se extremamente coriáceas, isto é, com aspecto de couro, e nervuras grosseiras, caracteres estes que colaboram para sua adaptabilidade a ambientes hostis, seus tecidos geralmente são arroxeados. O pinhão-bravo, por sua vez, possui folhas jovens relativamente grandes, carnosas e sensíveis à oxidação quando com ferimentos, o que pode ser explicado pela grande quantidade de seiva em seus pecíolos, nitidamente superior ao pinhão-manso e pinhão-roxo. Já este último apresenta folhas jovens carnosas, pequenas e delicadas, com forte coloração roxa.

Estudos de diversidade genética por meio de iniciadores moleculares em *Jatropha* spp. têm utilizado métodos baseados em tampão de extração CTAB, como

o Doyle e Doyle (1990), com ou sem modificações (BASHA; SUJATHA, 2007; BASHA; SUJATHA, 2009 e PAMIDIAMARRI et al., 2009).

No entanto, a metodologia proposta por Elias et al. (2004) também mostrou resultados promissores para *J. pohliana* e acabou sendo adotada para a extração de DNA dos acessos desta espécie, devido a suas maiores facilidades e vantagens de execução e principalmente por reduzir a oxidação do material vegetal obtido, o que, para uma espécie com folhas jovens extremamente carnosas, como é o caso de *J. pohliana*, é de fundamental importância.

Este método com modificações foi utilizado anteriormente para extração de DNA de mandioca (SIQUEIRA et al., 2009) e batata-doce (BORGES et al., 2009), com a obtenção de DNA de qualidade para ambas as espécies. A temperatura de desidratação das folhas de pinhão-manso, pinhão-roxo e pinhão-bravo foi a mesma utilizada para folhas de mandioca no trabalho de Siqueira et al. (2009), 60 °C, muito superior à utilizada para batata-doce por Borges et al. (2009) de 45 °C. Nesse caso, optou-se pela maior temperatura para *Jatropha* spp., por serem espécies pertencentes à família da mandioca, Euphorbiaceae. Durante a coleta de material *in situ*, por exemplo, para se formar uma coleção de plantas, uma das dificuldades é o armazenamento do material antes da análise, especialmente distante das facilidades de um laboratório. Geralmente, folhas jovens são coletadas e imediatamente imersas em nitrogênio líquido e transportadas congeladas a -20 °C ou -80 °C até o seu uso. Com a metodologia de Elias et al. (2004) modificada, até mesmo folhas secas podem ser utilizadas ou folhas jovens colocadas entre folhas de jornal, as quais são, então, levadas para secar em estufa ou ao sol (PEREIRA; BORGES; VEASEY, 2007). Folhas jovens podem, ainda, ser colocadas entre duas folhas de papel filtro juntamente com sílica gel e deixadas em laboratório para desidratar. O fino pó obtido pode ser depois facilmente armazenado em microtubos de 1,5 ml a -20 °C para análises futuras.

Esse estudo indicou que as espécies investigadas compartilharam 59,0% do total de marcas avaliadas, com taxa de polimorfismo de 39,6%, considerado um número relativamente alto. Souza et al. (2009) analisando 11 iniciadores de ISSR obtiveram baixa taxa de polimorfismo (23,09%). Ressalta-se que as diferenças entre acessos foram determinadas mais em função da frequência de bandas e não quanto

à presença ou ausência de bandas específicas. No entanto, deve-se salientar a ocorrência de bandas específicas em determinados acessos por meio de determinado iniciador, podendo, estas bandas futuramente serem úteis em programas de melhoramento genético.

Em agrupamentos hierárquicos, a delimitação dos grupos é determinada de maneira subjetiva, considerando-se os pontos de elevada mudança de nível no dendrograma, o que pode ocasionar diferenças nos padrões de agrupamento. Neste caso, como não se tem informação sobre o nível de relação genética entre os acessos, não se pode dizer qual método de agrupamento é mais preciso. Desse modo, quando diferentes métodos são comparados, diminui-se as chances de erros.

Observando-se os agrupamentos gerados pelos três métodos utilizados, nota-se que poucos acessos destacam-se por sua diversidade, sendo maior a variabilidade interespecífica, entre acessos de diferentes espécies, do que intraespecífica, dentro de uma mesma espécie, o que se justifica pelo maior grau de parentesco existente entre acessos de uma mesma espécie e também pela estreita base genética das espécies estudadas. Os acessos de pinhão-manso e de pinhão-bravo, que pelos métodos de UPGMA e vizinho mais próximo foram alocados em poucos grupos muito próximos entre si, pelo método do vizinho mais distante foram subdivididos em vários grupos, o que mostra uma maior acurácia ou precisão na discriminação dos grupos de acessos.

Ram et al. (2008) encontraram 80,2% de polimorfismo ao analisarem a diversidade genética em oito espécies do gênero *Jatropha*, incluindo *J. curcas* e *J. gossypiifolia*, um indicativo da existência de elevada variabilidade interespecífica no gênero *Jatropha*. Os autores observaram, ainda, pela análise de agrupamento por UPGMA, a formação de três grupos distintos, um deles formado apenas por acessos de *J. curcas*. Resultados semelhantes foram encontrados nesse estudo, cujo dendrograma por UPGMA formado a partir de dados moleculares gerou dez grupos distintos, utilizando-se 34% de dissimilaridade, onde foi possível se observar acessos de pinhão-manso em grupos distintos, porém muito próximos entre si, do mesmo modo ocorrem com os acessos de *J. pohliana* e *J. gossypiifolia*.

Dehgan e Webster (1979) em seu estudo de taxonomia clássica do gênero *Jatropha* concluíram que *J. curcas* é a espécie ancestral primitiva do gênero, devido

a sua diferenciação morfológica e que espécies de outras seções evoluíram a partir dela e de outras formas ancestrais. Neste trabalho os resultados mostram que acessos de *J. curcas* distinguem-se molecularmente de acessos das outras duas espécies, reforçando mais uma vez essa hipótese.

Sujatha, Makkar e Becker (2005) estudando a diversidade genética entre variedades tóxicas e não-tóxicas de *J. curcas*, usando iniciadores RAPD, encontraram porcentagem de similaridade genética de 96,3%. Em outro trabalho Sudheer et al. (2009) relatou 84,9% e 83,6% entre plantas de *J. curcas* tóxicas e não-tóxicas analisadas por RAPD e AFLP, respectivamente, e identificou marcadores específicos de RAPD e AFLP para ambas as variedades. Estudo inter e intra-populacional realizado utilizando iniciadores RAPD e ISSR em 42 acessos de *J. curcas* procedentes de diferentes regiões da Índia e um genótipo não-tóxico do México apresentou 42,0 e 37,4% de polimorfismo por RAPD e ISSR, respectivamente (BASHA; SUJATHA, 2007). Além disso, iniciadores ISSR têm sido utilizados também com sucesso para estimar o nível de diversidade genética intra e interespecífica em outras espécies, incluindo, arroz (JOSHI et al., 2000), trigo (NAGAOKA; OGIHARA, 1997), *Eleusine coracana* (SALIMATH et al., 1995), *Vigna* (AJIBADE; WEEDEN; CHITE, 2000), batata-doce (HUANG; SUN, 2000) e *Plantago* (WOLFF; MORGAN-RICHARDS, 1998).

A formação de grupos principais contendo a maior parte dos acessos de pinhão-manso estudados evidencia a baixa diversidade genética entre indivíduos de diferentes origens e reforça a ideia de que genótipos de pinhão-manso de diferentes procedências possuem uma ancestrabilidade comum, excluindo o conceito de diversidade genética por origem. Oliveira (2007), trabalhando com iniciadores RAPD verificaram a formação de quatro grupos distintos independente da origem dos genótipos. A falta de relação entre o padrão de similaridade encontrada e a procedência geográfica de acessos já foi relatada em outros trabalhos (BASHA; SUJATHA, 2007). Esforços adicionais para cobrir lacunas no conhecimento sobre a diversidade genética do gênero *Jatropha* usando iniciadores moleculares e caracteres morfológicos descritos no presente trabalho são obviamente necessários.

## 6. CONCLUSÃO

Pelas observações auferidas no decorrer deste trabalho constatou-se que:

Os iniciadores ISSR e os caracteres morfológicos utilizados nos permitem distinguir espécies e acessos do gênero *Jatropha*;

Há diversidade genética intra e interespecífica para três espécies de *Jatropha* estudadas, principalmente em relação aos seguintes caracteres: coloração de folhas jovens e adultas, estrutura de plantas, número de lóbulos foliares, altura de plantas, diâmetro de caules, ciclo de maturação de frutos, comprimento e largura de sementes;

O método de extração de DNA proposto por Doyle e Doyle (1990) com modificações fornece os melhores resultados para extração de DNA de plantas de *Jatropha* spp.;

O protocolo de Elias et al. com modificações é mais fácil de ser aplicado em espécies com folhas mais carnosas, como *J. pohliana* e *J. gossypifolia*, mostrando-se um método promissor para estas espécies;

A variabilidade intraespecífica para as espécies *Jatropha curcas* e *Jatropha pohliana* é baixa;

A caracterização morfológica e molecular de acessos do gênero *Jatropha* pode ser muito útil no monitoramento da variabilidade genética em bancos de germoplasma, quando do estabelecimento de coleções nucleares.

## 7. REFERÊNCIAS

ACCARINI, J. H. Biodiesel no Brasil: estágio atual e perspectivas. **Revista Bahia Análise e Dados**, Salvador, v. 16, n. 1, p. 51-63, 2006.

AJIBADE, S. R.; WEEDEN, N. F.; CHITE, S. M. Inter-simple sequence repeat analysis of genetic relationships in the genus *Vigna*. **Euphytica**, Dordrecht, v. 111, n. 1, p. 47-55, 2000.

ALMEIDA, C. M. A. **Diversidade genética em populações de *Aechmea fulges* Brongn. (Bromeliaceae) em fragmentos de Mata Atlântica em Pernambuco**. 2006. 57 f. Dissertação Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2006.

AÑEZ, L. M. M.; COELHO, M. F. B.; ALBUQUERQUE, M. C. F.; DOMBROSKI, J. L. D. Caracterização morfológica dos frutos, das sementes e do desenvolvimento das plântulas de *Jatropha elliptica* Müell. Arg. (Euphorbiaceae). **Brazilian Journal of Botany**, São Paulo, v. 28, n. 3, p. 563-568, 2005.

ARRIEL, N. H. C. **Diversidade genética em gergelim (*Sesamum indicum* L.) a partir de marcadores moleculares (RAPD) e caracteres morfológicos e agronômicos**. 2004. 114 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", Jaboticabal, 2004.

ARRIEL, N. H. C.; MAURO, A. O. D.; MAURO, S. M. Z. D.; BAKKE, O. A.; UNÊDA-TREVISOLI, S. H.; COSTA, M. M.; CAPELOTO, A.; CORRADO, A. R. Técnicas multivariadas na determinação da diversidade genética em gergelim usando marcadores RAPD. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 41, n. 5, p. 801-809, 2006.

ARRUDA, F. P.; BELTRÃO, N. E. M.; ANDRADE, A. P.; PEREIRA, W. E.; SEVERINO, L. S. Cultivo de pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) como alternativa para o semi-árido nordestino. **Revista Brasileira de Óleo Fibrose**, Campina Grande, v. 8, n. 1, p. 789-799, 2004.

AVELAR, R. C.; SILVA, F. M.; CASTRO NETO, P.; FRAGA, A. C. Avaliação do desenvolvimento de pinhão- manso (*Jatropha curcas* L.) do banco de germoplasma da UFLA. In: ANAIS DO CONGRESSO BRASILEIRO DE PLANTAS



OLEAGINOSAS, ÓLEOS, GORDURAS E BIODIESEL, 5., 2008, Lavras. **Anais eletrônicos...** Lavras: [UFPA], 2008. 1 CD-Room.

BARROSO, M. B.; MORIN, N. P.; PEIXOTO, A. L.; ICHASO, C. L. F. **Frutos e sementes**: morfologia aplicada à sistemática de dicotiledôneas. 2. ed. Viçosa, MG: Editora UFV, 1999. 444 p.

BASHA, S. D.; SUJATHA, M. Genetic analysis of *Jatropha* species and interspecific hybrids of *Jatropha curcas* using nuclear and organell specific markers. **Euphytica**, Wageningen, v. 168, n. 2, p. 197-214, 2009.

BASHA, S. D.; SUJATHA, M. Inter and intra-population variability of *Jatropha curcas* (L.) characterized by RAPD and ISSR markers and development of population-specific SCAR markers. **Euphytica**, Wageningen, v. 156, n. 3, p. 375-386, 2007.

BORGES, A.; ROSA, M. S.; RECCHIA, G. H.; QUEIROZ-SILVA, J. R.; BRESSAN, E. A.; VEASEY, E. A. CTAB methods for DNA extraction of sweetpotato for microsatellite analysis. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 66, n. 4, p. 529-534, 2009.

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

BRASIL. Lei nº 11.097, de 13 Janeiro de 2005. Dispõe sobre a introdução do biodiesel na matriz energética brasileira e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 14 jan. 2005. Seção 1.

BUSSAB, W. de O.; MIAZAKI, E. S.; ANDRADE, D. F. **Introdução à análise de agrupamentos**. São Paulo: Associação Brasileira de Estatística, 1990. 105 p.

CAIXETA, E. T.; OLIVEIRA, A. C. B. de; BRITO, G. G. de; SAKIYAMA, N. S. Tipos de marcadores moleculares. In: BORÉM, A.; CAIXETA, E.T. (Ed.). **Marcadores moleculares**. Viçosa: UFV, 2006. 374 p.

CARNIELLI, F. **O combustível do futuro**. Belo Horizonte: UFMG, 2003. v. 29. Boletim, n. 1413. Disponível em: <<http://www.ufmg.br/boletim/bol1413/>>. Acesso em: 22 ago. 2012.

COLE-RODGERS, P.; SMITH, D. W.; BOSLAND, P. W. A novel statistical approach to analyze genetic resource evaluations using Capsicum as an example. **Crop Science**, Madison, v. 37, n. 3, p.1000-1002, 1997.

COLLINS, F. S.; BROOKS, L. D.; CHAKRAVARTI, A. A DNA polymorphism discovery resource for research on human genetic variation. **Genome**, Bethesda, v. 8, n. 12, p. 1229-1231, 1998.

CONAB- Companhia Nacional de Abastecimento. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 01 nov. 2012.

CONCEIÇÃO, M. M.; DANTAS, M. B.; DANTAS, J. P.; LIMA, A. E. A.; SILVA, M. C. D.; FERNANDO, C.; SOUZA, A. G.; SANTOS, I. M. G.; VASCONCELOS, A. F. F. Potencialidade do pinhão bravo para utilização como biodiesel. In: CONGRESSO INTERNACIONAL DE AGROENERGIA E BIOCOMBUSTÍVEIS, n. 3, 2007, Teresina. **Anais...** Teresina: v. 1, n. 3, p. 107, 2007..

CORRÊA, A. A. P. **Padronização de protocolos para extração de DNA em espécies do gênero *Jatropha***. 2011. 53 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Tecnologia em Biocombustíveis) - Faculdade de Tecnologia de Jaboticabal - Fatec, Jaboticabal, 2011.

CORRÊA, R. X.; ABDELNOOR, R. V.; FALEIRO, F. G.; CRUZ, C. D.; MOREIRA, M. A.; BARROS, E. G. Genetic distances in soybean based on RAPD markers. **Bragantia**, Campinas, v. 58, n. 1, p. 15-22, 1999.

CORTESÃO, M. **Culturas tropicais: plantas oleaginosas**. Lisboa: Clássica, 1956. 231 p.

CRUZ, C. D. **Programa Genes: aplicativo computacional em genética e estatística**. Versão Windows. Viçosa: Editora UFV, 2006. 648 p.

CRUZ, C. D.; CARNEIRO, P. C. S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa, MG: Ed. UFV, 2006. v. 2, 585 p.

CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. J.; CARNEIRO, P. C. S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. 4. ed. Viçosa, MG: Editora UFV, 2012. v. 1, 514 p.

DART- DIVERSITY ARRAYS TECHNOLOGY. **Protocolo de extração de DNA de plantas.** [S.l.: s.n.], [20--]. Disponível em: <[http://www.DiversityArrays.com/pub/DArT\\_DNA\\_isolation.pdf](http://www.DiversityArrays.com/pub/DArT_DNA_isolation.pdf)>. Acesso em: 01 dezembro 2012.

DEHGAN, B.; WEBSTER, G. L. Morphology and intergeneric relationship of the genus *Jatropha*. **University of California Publications Botany**, Berkeley, v. 74, p. 1-7, 1979.

DELLAPORTA, S. L.; WOOD, J.; HICKS, J. B. A plant DNA miniprep. Version II. **Plant Molecular Biology Reporter**, Athens, v. 1, n. 4, p. 19-21, 1983.

DIAS, L. A. S. Análises multidimensionais. In: ALFENAS, A. C. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microorganismos.** Viçosa: UFV, 1998. 574 p.

DIAS, L. A. S.; LEME, L. P.; LAVIOLA, B. G.; PALLINI FILHO, A.; PEREIRA, O. L.; CARVALHO, M.; MANFIO, C. E.; SANTOS, A. S.; SOUSA, L. C. A.; OLIVEIRA, T. S.; DIAS, D. C. F. S. **Cultivo de Pinhão-manso (*Jatropha curcas* L) para produção de óleo combustível.** Viçosa, MG: Editora UFV, 2007, 40 p.

DIVAKARA, B. N.; UPADHYAYA, H. D.; WANI, S. P.; GOWDA, C. L. L. Biology and genetic improvement of *Jatropha curcas* L.: a review. **Applied Energy**, Oxford, v. 87, n. 3, p. 732-742, 2010.

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

DRUMMOND, O. A.; PURCINO, A. A. C.; CUNHA, L. H. S.; VELOSO, J. M. **Cultura do pinhão manso.** Belo Horizonte: EPAMIG, 1984. n. 131, 6 p.

DUARTE, J. M.; SANTOS, J. B. dos; MELO, L. C. Comparison of similarity coefficients based on RAPD markers in the common bean, **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 22, n. 3, p. 427-432, 1999.

ELIAS, M.; MÜHLEN, G. S.; McKEY, D.; ROA, A. C.; TOHME, J. Genetic diversity of traditional South American landraces of cassava (*Manihot esculenta* Crantz): an

analysis using microsatellites. **Economic Botany**, Bronx, v. 58, n. 2, p. 242-256, 2004.

EMBRAPA ALGODÃO. **Descritores de mamona utilizados pela Embrapa Algodão**. Campina Grande, 2008. 39 p. (Documentos, 192).

EPAMIG - EMPRESA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA DE MINAS GERAIS. **Coletânea sobre pinhão-manso, na EPAMIG**. [Belo Horizonte]: Epamig, 2003. Disponível em: <[www.epamig.br/index.php?option=com\\_docman&task=doc\\_download&gid=14&Itemid=116](http://www.epamig.br/index.php?option=com_docman&task=doc_download&gid=14&Itemid=116)>. Acesso em: 31 out. 2011.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília, DF: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220 p. (Documentos, 20).

GODWIN, I. D.; AITKEN, E. A. B.; SMITH, L. W. Application of inter simple sequence repeat (ISSR) markers to plant genetics. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 18, n. 9, p. 1524-1528, 1997.

GÓIS, I. B.; SILVA, R.; BOARI, A. J.; OLIVEIRA, A. dos S.; FRAGA, A. C. Caracterização Isoenzimática de acessos de pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA, 2., 2006, Campina Grande. **Anais...** Campina Grande: EMBRAPA Algodão, 2006.

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

GOWER, J. C.; LEGENDRE, P. Metric and Euclidean properties of dissimilarity coefficients. **Journal of Classification**, New York, v. 3, n. 1, p. 5-48, 1986.

HUANG, J.; SUN, S. M. Genetic diversity and relationships of sweet potato and its wild relatives in *Ipomoea* series Batatas (Convolvulaceae) as revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) and restriction analysis of chloroplast DNA. **Theoretical and Applied Genetics**, Heidelberg, v. 100, n. 7, p. 1050-1060, 2000.

JACKSON, A. A.; SOMERS, K. M.; HARVEY, H. H. Similarity coefficients: measures for co-occurrence and association or simply measures of occurrence. **American Naturalist**, Chicago, v. 133, n. 3, p. 436-453, 1989.

JOHNSON, R. A.; WICHERN, D. W. **Applied multivariate statistical analysis**. New Jersey: Prentice-Hall, 1988. 607 p.

JOSHI, S. P.; GRUPTA, V. S.; AGGARWAL, R. K.; RANJEKAR, P. K.; BRAR, D. S. Genetic diversity and phylogenetic relationship as revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) polymorphism in the genus *Oryza*. **Theoretical and Applied Genetics**, Heidelberg, Local, v. 100, n. 8, p. 1311-1320, 2000.

KRESOVICH, S.; SZEWC-MCFADDEN, A. K.; BLICK, S. Abundance and characterization of simple sequence repeats (SSRs) isolated from a size-fractionated genomic library of *Brassica napus* L. (rapeseed). **Theoretical and Applied Genetics**, Heidelberg, v. 91, n. 2, p. 206-211, 1995.

LEMÕES, J. S.; MOREIRA, L. L.; KNEIB, R. B.; SILVA, S. D. A. E.; CASAGRANDE JÚNIOR, J. G.; ÁVILA, T. T. Comparação entre protocolos de extração de DNA de pinhão manso. In: SIMPÓSIO ESTADUAL DE AGROENERGIA, 2008, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: EMBRAPA Clima Temperado, 2008.

LITT, M.; LUTY, J. A. A hyper variable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **The American Journal of Human Genetics**, Boston, v. 44, n. 3, p. 398-401, 1989.

LIU, B.; WENDEL, J. F. Intersimple sequence repeat (ISSR) polymorphisms as a genetic marker system in cotton. **Molecular Ecology Notes**, p. 205-208, 2001.

MELO, M. F. V.; SILVA-MANN, R.; SANTOS, H. O.; SOUZA, E. M. Caracterização morfológica de acessos de *Jatropha curcas* L. do banco de germoplasma da Universidade Federal de Sergipe. In: CONGRESSO DA REDE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE BIODIESEL, 2., 2007, Brasília, DF. **Anais...** Brasília, DF: MCT: ABIPTI, 2007. 1 CD-ROM, 2007.

MESSMER, M. M.; MELCHINGER, A. E.; HERRMANN, R. G.; JURGEN, B. Relationships among early European maize inbreds, II: comparison of pedigree and RFLP data. **Crop Science**, Madison, v. 33, n. 5, p. 944-950, 1993.

MEYER, A. S. **Comparação de coeficientes de similaridade usados em análises de agrupamentos com dados de marcadores moleculares dominantes**. 2002. 106 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

MEYER, A. S.; GARCIA, A. A. F.; SOUZA, A. P.; SOUZA, J. R. C. L. Comparison of similarity coefficients used for cluster analysis with dominant markers in maize (*Zea mays* L). **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 27, n. 1, p. 83-91, 2004.

MÜHLEN, G. S.; MARTINS, P. S.; ANDO, A. Variabilidade genética de etnovarietades de mandioca, avaliada por marcadores de DNA. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 57, n. 2, p. 319-328, 2000.

MULLIS, K.; FALOONA, F. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalyzed chain reaction. **Methods in Enzymology**, San Diego, v. 155, n. 3, p. 335-350, 1987.

NAGAOKA, T.; OGIHARA, Y. Applicability of inter-simple sequence repeat polymorphisms in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers. **Theoretical and Applied Genetics**, Heidelberg, v. 94, n. 5, p. 597-602, 1997.

OLIVEIRA, A. S. Diversidade genética entre acessos de *Jatropha* sp. In: CONGRESSO DA REDE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE BIODIESEL, 2., 2007, Brasília, DF. **Anais...** Brasília, DF: MCT/ABIPTI, 2007. 451 p.

OLIVEIRA, J. S.; LEITE, P. M.; SOUZA, L. B. de; MELLO, V. M.; SILVA, E. C.; RUBIM, J. C.; MENEGHETTI, S. M. P.; SUAREZ, P. A. Z. Avaliação preliminar de parâmetros físico-químicos do óleo e biodiesel de Pinhão Roxo (*Jatropha gossypifolia* L.). In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 2006, Águas de Lindóia. **Anais...** Águas de Lindóia: SBQ, 2006. Disponível em: <<https://sec.s bq.org.br/cd29ra/resumos/T0777-1.pdf>>. Acesso em: 19 nov. 2011.

PAMIDIAMARRI, D. V. N. S.; PANDYA, N.; REDDY, M. P.; RADHAKRISHNAN, T. Comparative study of interspecific genetic divergence and phylogenetic analysis of genus *Jatropha* by RAPD and AFLP: genetic divergence and phylogenetic analysis of genus *Jatropha*. **Molecular Biology Reporter**, Athens, v. 36, n. 5, p. 901-907, 2009.

PARAN, I.; MICHELMORE, R. W. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. **Theoretical and Applied Genetics**, Heidelberg, v. 85, n. 8, p. 985-993, 1993.

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

PEREIRA, K. J. C.; BORGES, A.; VEASEY, E. A. Diversidade genética de mandioca em roças de agricultura tradicional na Reserva Amanã (RDSA), Amazônia. **Revista da Associação Brasileira de Horticultura**, local, v. 25, p. 86, 2007. Suplemento.

PINHÃO MANSO. **A planta**: pinhão manso – *Jatropha curcas*. [S.l.]: Biodieselbr Online, 2011a. Disponível em: <<http://www.pinhaomanso.com.br/pinhaomanso.html>>. Acesso em: 26 out. 2011.

PRIOLLI, R. H. G.; MENDES-JUNIOR, C. T.; ARANTES, N. E.; CONTEL, E. P. B. Characterization of brasilian soybean cultivars using microsatellite markers. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 25, n. 2, p. 185-193, 2002.

PURCINO, A. A. C.; DRUMMOND, O. A. **Pinhão-manso**. Belo Horizonte: Epamig, 1986. 7 p.

RAM, G. S.; PARTHIBAN, K. T.; SENTHIL, K. R.; THIRUVENGADAM, V.; PARAMATHMA, M. Genetic diversity among *Jatropha* species as reveled by RAPD markers. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v. 55, n. 6, p. 803-809, 2008.

REDDY, M. P.; SARLA, N.; SIDDIQ, E. A. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application inplant breeding. **Euphytica**, Kluwer Academic Publishers Printed in the Netherlands, v. 128, p. 9-17, 2002.

SALIMATH, S. S.; OLIVEIRA, A. C.; GODWIN, I. D.; BENNETZEN, J. L. Assessment of genome origins and genetic diversity in the genus *Eleusine* with DNA markers. **Genome**, Maryland Heights, v. 38, n. 4, p. 757-763, 1995.

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

SIQUEIRA, M. V. B. M.; QUEIROZ-SILVA, J. R.; BRESSAN, E. A.; BORGES, A.; PEREIRA, K. J. C.; PINTO, J. G.; VEASEY, E. A. Genetic characterization of cassava (*Manihot esculenta*) landraces in Brazil assessed with simple sequence repeats. **Genetics Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 32, n. 1, p. 104-110, 2009.

SNEATH, P. H. A.; SOKAL, R. R. **Numeric taxonomy**: the principles and practice of numerical classification. San Francisco: W.H. Freeman, 1973. 573 p.

SOARES, B. O. **Diversidade genética de genótipos de pinhão-manso por meio de RAPD e ISSR**. 2010. 54 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade Estadual de Montes Claros, Jarnaúba, 2010.

SOUZA, D. A.; MOREIRA, G. B. R.; GUIMARÃES, J. F. R.; LIBRELON, S. S.; FERNANDES, T. P.; NIETSCHKE, S.; COSTA, M. R. ANÁLISE da diversidade genética intrapopulacional de pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) com marcadores ISSR. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PLANTAS OLEAGINOSAS, ÓLEOS, GORDURAS E BIODIESEL, 6., 2009, Montes Claros. **Anais...** Montes Claros: Editora, 2009. p. 2158-2164. 1 CD-ROM.

SOUSA, M. T. B. Análise da utilização do biodiesel como alternativa para o desenvolvimento sustentável. In: CONGRESSO DE PESQUISA E INOVAÇÃO DA REDE NORTE NORDESTE DE EDUCAÇÃO TECNOLÓGICA, 1., 2006, Natal. **Anais...** Natal: Editora, 2006.

SUDHEER, P. D. V. N.; SINGH, S.; MASTAN, S. G.; PATEL, J.; REDDY, M. P. Molecular characterization and identification of markers for toxic and non-toxic varieties of *Jatropha curcas* L. using RAPD, AFLP and SSR markers. **Molecular Biology Reports**, Dordrecht, v. 36, n. 6, p. 1357-1364, 2009.

SUJATHA, M.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. Shoot bud proliferation from axillary nodes and leaf sections of non-toxic *Jatropha curcas* L. **Plant Growth Regul**, local, v. 47, n. , p. 83-90, 2005.

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

TOMINAGA, N.; KAKIDA, J.; YASUDA, E. K. **Cultivo de pinhão-manso para produção de biodiesel**. Viçosa, MG: CPT, 2007. 220 p.



VASCONCELOS, G. C. L.; ARRIEL, N. H. C.; MEDEIROS, K. A. A. L.; MEDEIROS, O. S.; MELO, J. I. M.; LUCENA, A. M. A.; FREIRE, M. A. O. Caracterização botânica de acessos de pinhão manso do banco de germoplasma da Embrapa Algodão. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA, SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE OLEAGINOSAS ENERGÉTICAS, 2010, João Pessoa. **Anais...** Campina Grande: Embrapa Algodão, 2010. p. 1606-1611.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; LEE, T. V.; HORNER, M.; FRITJERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 23, n. 21, p. 4407-4414, 1995.

WEIR, B. S. **Genetic data analysis II**. 2. ed. Sunderland: Sinauer Associates, 1996. 445 p.

WILLIAMS, K. A.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 18, n. 22, p. 6531-6535, 1990.

WOLFF, K.; MORGAN-RICHARDS, M. PCR markers distinguish *Plantago major* subspecies. **Theoretical and Applied Genetics**, Heidelberg, v. 96, n. 2, p. 282-286, 1998.

ZHANG, J.; STEWART, J. Economical and rapid method for the extracting cotton genomic DNA. **Journal of Cotton Science**, Cordova, v. 4, n. 3, p. 193-201, 2000.

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