

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

EDUARDO DE ANDRADE BRESSAN

**Variabilidade genética e estimativa da taxa de cruzamento do pinhão  
manso (*Jatropha curcas* L.) empregando marcadores moleculares**

Piracicaba

2011



EDUARDO DE ANDRADE BRESSAN

**Variabilidade genética e estimativa da taxa de cruzamento do pinhão manso  
(*Jatropha curcas* L.) empregando marcadores moleculares**

Tese apresentada ao Centro de Energia Nuclear  
na Agricultura da Universidade de São Paulo para  
obtenção do título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Biologia na Agricultura e  
no Ambiente

Orientador: Prof. Dr. Antonio Vargas de Oliveira  
Figueira

Piracicaba

2011

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

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

**Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP**

Bressan, Eduardo de Andrade

Variabilidade genética e estimativa da taxa de cruzamento do pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) empregando marcadores moleculares /Eduardo de Andrade Bressan; orientador Antonio Vargas de Oliveira Figueira. - - Piracicaba, 2011.

208 f.: il.

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

1. Apomixia 2. Diversidade genética 3. Genética de populações 4. Plantas oleaginosas I. Título

CDU 575.17 : 633.85

“THE HIGHEST REWARD FOR A MAN’S TOIL IS NOT WHAT HE  
GETS FOR IT BUT WHAT HE BECOMES BY IT.”

“A MAIS ALTA RECOMPENSA PARA O TRABALHO DE UM  
HOMEM NÃO É O QUE ELE RECEBE PARA ISSO, MAS O QUE ELE  
SE TORNA”

**John Ruskin**  
**(1819 – 1900)**

*À minha família, que sempre soube compreender e  
administrar os momentos difíceis que passamos afastados  
durante a realização deste trabalho. Pelo carinho, amor e  
paciência.*

***DEDICO***



## AGRADECIMENTOS

Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP) e ao Programa de Pós-Graduação do CENA, pela qualidade do ensino, estrutura e oportunidade para desenvolver o doutorado;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela bolsa concedida e suporte financeiro ao projeto (FAPESP: 2007/04840-2);

Ao Prof. Dr. Antonio Vargas de Oliveira Figueira que me orientou na execução deste trabalho e em minha orientação profissional;

Ao Prof. Dr. Lee Tseng Sheng Gerald, pelo entusiasmo, orientação e prontidão nos momentos de grande dificuldade;

Ao Dr. Alexandre Magno Sebbenn, pelas valiosas sugestões e contribuições ao longo do desenvolvimento deste trabalho;

À Profa. Dra. Erika Cristina Jorge (UFMG), pela contribuição na construção da biblioteca genômica enriquecida em microssatélites;

Ao Prof. Dr. Luiz Lehmann Coutinho e a Bióloga M.Sc. Nirlei Aparecida Silva, do Laboratório de Biotecnologia Animal, pelo sequenciamento das bibliotecas genômicas;

Ao Dr. Nicolas Carels (FIOCRUZ), pelas sugestões sobre o estudo do gene ligado a Geranyl Pirophosphatase Synthase;

Ao Prof. Dr. Giancarlo Conde Xavier, pelas sugestões sobre as relações filogenéticas;

Ao Sr. Maurício Nogueira e a Empresa Biocapital e Participações SA, pela ajuda e entusiasmo durante o desenvolvimento deste trabalho;

Aos Professores Dr. Augusto Tulmann Neto e Dr. Akihiko Ando, pela inestimável ajuda durante meu ingresso no CENA;

Ao primo José Luiz Rocha de Andrade, pelo incentivo durante o desenvolvimento deste trabalho;

À Profa. Dra. Elizabeth Ann Veasey, pela amizade e prontidão nos momentos difíceis;

Ao Dr. Renato Rodrigues Ferreira, pela amizade e contribuição na minha formação científica, assim como pelas valiosas sugestões ao longo deste trabalho;

Ao Prof. Dr. Gildemberg Amorim Leal Junior (UFAL), pela amizade e contribuição na minha formação;

À bióloga Vitória Schimdt (CCA/UFSCar), pela amizade e contribuição na minha formação desde a graduação;

Ao Dr. Joni Esrom Lima, pela amizade, incentivo e valiosas sugestões;

À M.Sc. Danielle Camargo Scotton, pela amizade e ajuda durante o desenvolvimento deste trabalho;

Aos técnicos do LAMP, Raquel, Wlamir, Luis Eduardo, Paulo, Inês e Sr. José, pelo suporte oferecido durante a realização deste trabalho;

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

À Bióloga Mônica Lanzoni Rossi e a Profa. Dra. Neuza de Lima Nogueira, pela ajuda nas análises microscópicas e também obtenção das imagens;

Ao pessoal da biblioteca do CENA/USP: Marília, Renata, Raquel, Adriana e Celsinho, pela paciência, presteza e simpatia;

Ao pessoal da Pós-Graduação: Neuda, Cláudia, Alzira, Sônia e Fábio por todo apoio;

Ao pessoal da Informática: Gabriel, Fabrício, George, João Geraldo, Chico Pereira e Silvana pelo apoio;

À secretária da Diretoria Sônia Storer, pela amizade, presteza e simpatia;

Aos amigos do CENA: Alfredo, Eduardo, Fernando, Moysés, Paulo, Tião, Douglas, Guerreiro, Cláudio, Israel, Osmir, Serginho, Juscelino, Pimenta e Marcelo;

Aos colegas e amigos do Laboratório de Melhoramento de Plantas/CENA: Aline Pssingnollo, Aline Harissis, Amanda, André, Ângela, Deborah, Edgard, Ilse, Juliana Deganello, Juliana Leles, João, Layanne, Letícia, Lorena, Marielle, Mariana, Melissa, Roberto, Taís, Thaísa, Vanessa e Verusca, pelos momentos de aprendizado em conjunto;

Aos eternos amigos Celso Gaspar, Cláudio Lopes, João Nebó, Onildo de Jesus e Everton Hilo, pelas discussões e o constante aprendizado durante o desenvolvimento deste trabalho;

À todos aqueles que de forma direta ou indireta que contribuíram para a realização deste trabalho.

**MUITO OBRIGADO.**

## RESUMO

BRESSAN, E. A. **Variabilidade genética e estimativa da taxa de cruzamento do pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) empregando marcadores moleculares.** 2011. 208 f. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

O pinhão manso é uma pequena árvore tropical que adquiriu importância econômica pelo conteúdo de óleo em suas sementes e pela possibilidade de sua utilização para produção de biocombustível. As sementes e o óleo do pinhão manso são tóxicos devido principalmente à presença de ésteres de forbol, o que dificulta a sua utilização direta para o consumo humano e também dos resíduos para a alimentação animal. A falta de programas de melhoramento e cultivares comerciais e problemas com pragas e doenças estão desestimulando o cultivo do pinhão manso pelo mundo. Por se tratar de uma espécie semi-domesticada, a utilização de marcadores moleculares como ITS, PCR-RFLP, microssatélites e TRAP poderia auxiliar nos estudos de diversidade genética, visando o desenvolvimento de variedades adaptadas às necessidades dos agricultores. O objetivo deste estudo foi caracterizar a variabilidade genética de acessos de pinhão manso depositados no Banco de Germoplasma da Universidade Federal de São Carlos, além de possibilitar estudos sobre as relações entre as populações, centros de diversidade e determinar o sistema reprodutivo da espécie. Os resultados são discutidos destacando que a maior parte da diversidade encontra-se entre as populações estudadas. Os resultados derivados dos quatro marcadores utilizados corroboram que o centro de diversidade da espécie possivelmente está na América, com destaque para o México, Brasil e Colômbia. Os resultados apontam também para a diferenciação genética dos acessos atóxicos dos mexicanos quando comparados com os demais acessos tóxicos de pinhão manso. Os marcadores microssatélites desenvolvidos indicam que o pinhão manso apresenta um sistema misto de reprodução, combinando autofecundações, apomixia e cruzamento entre indivíduos aparentados, o que pode explicar a menor diversidade genética encontrada dentro das populações. Devido ao sistema misto de reprodução e aos acasalamentos correlacionados, a coleta de sementes de polinização aberta para fins de melhoramento ou conservação deve ser conduzida em um número de árvores acima de 100, visando garantir uma amostra estruturada.

**Palavras-chave:** Diversidade genética. Sistema reprodutivo. Marcadores moleculares. Árvore tropical.



## ABSTRACT

BRESSAN, E. A. **Genetic variability and estimation of outcrossing rate of physic nut (*Jatropha curcas* L.) using molecular markers.** 2011. 208 f. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

Physic nut (*Jatropha curcas* L.) is a tropical tree that has acquired economic importance for the content of oil in its seeds and the possibility of its use for biofuel production. However, oil seeds and physic nut are toxic because of the presence of secondary metabolites such as phorbol esters which makes its use directly for human consumption and also its waste for animal feed difficult. The lack of commercial varieties and problems with pests and diseases are making physic nut cultivation in the world unattractive. The use of molecular markers such as ITS, PCR-RFLP, microsatellites and TRAP can help in studies of genetic diversity, aimed at developing varieties adapted to farmers needs. The aim of this study was to characterize the genetic variability of physic nut accessions deposited in the Germplasm Bank of the ‘Universidade Federal de São Carlos’, in addition to allowing studies on the relationship among accessions, centers of diversity and reproductive system. Results are discussed highlighting that most diversity is concentrated among populations. The four markers used indicated that the center of diversity of this species is probably in America with emphasis on Mexico, Brazil and Colombia. The microsatellite markers indicate that physic nut has a mixed system of reproduction, combining self-pollinations, apomixis and crossing between related individuals which may explain the small genetic diversity found within populations. Due to the mixed system of reproduction and correlated mating, the collection of open-pollinated seeds for plant breeding or conservation should be conducted in a number of trees above 100 in order to ensure a structured sample.

**Keywords:** Genetic diversity. Mating system. Molecular markers. Tropical tree.



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 3.1</b> - Valores médios da quantificação e relação de pureza do DNA genômico isolado a partir de folhas recém expandidas de pinhão manso. ....	57
<b>Tabela 4.1</b> – Fragmento gerado pela amplificação, digestão (PCR-RFLP) das regiões ITS-rDNA.....	73
<b>Tabela 4.2</b> – Tamanho do fragmento gerado pela amplificação e sequenciamento .....	79
<b>Tabela 5.1</b> - Detalhes dos acessos de pinhão manso utilizados para validação dos iniciadores.....	93
<b>Tabela 5.2</b> – Característica dos nove iniciadores microssatélites desenvolvido.....	104
<b>Tabela 5.3</b> – Avaliação dos iniciadores para seis populações de <i>J. curcas</i> .....	105
<b>Tabela 5.4</b> - Transferibilidade de nove pares de iniciadores desenvolvidos para <i>J. curcas</i> e testados para outras espécies de Euphorbiaceae.....	108
<b>Tabela 6.1</b> - Características de oito marcadores microssatélites isolados de pinhão manso.....	118
<b>Tabela 6.2</b> - Característica do loco e parâmetros de diversidade genética .....	124
<b>Tabela 6.3</b> - Característica do loco e parâmetros de diversidade genética .....	125
<b>Tabela 6.4</b> - Frequências alélicas e a estrutura genética.....	128
<b>Tabela 6.5</b> - Análise de variância molecular (AMOVA) para três níveis hierárquicos .....	130
<b>Tabela 7.1</b> - Sequências de iniciadores fixos e arbitrários utilizados para amplificar marcadores TRAPs nos acessos de pinhão manso .....	147
<b>Tabela 7.2</b> - Análise de variância molecular (AMOVA) para três níveis hierárquicos .....	153
<b>Tabela 8.1</b> – Procedência de 15 árvores matrizes utilizadas para determinar o sistema de reprodução em uma população base de pinhão manso.....	171
<b>Tabela 8.2</b> – Seis locos microssatélites de pinhão manso com seus iniciadores específicos e suas características .....	174
<b>Tabela 8.3</b> – Diversidade genética e índice de fixação para árvores matrizes e progênes de uma população base de pinhão manso.....	178
<b>Tabela 8.4</b> – Estimativa de parâmetros do sistema de reprodução, coancestria e tamanho efetivo em uma população base de pinhão manso.....	181

<b>Tabela 8.5</b> – Sistema de cruzamento e parâmetros intra-familiares em uma população de pinhão manso. ....	182
<b>Anexo A</b> – Estimativa de parâmetros do sistema de reprodução, coancestria e tamanho efetivo em uma população base de pinhão manso.....	191
<b>Anexo B</b> – Sistema de cruzamento e parâmetros intra-familiares em uma população de pinhão manso. ....	193
<b>Anexo C</b> – Estimativa de parâmetros do sistema de reprodução, coancestria e tamanho efetivo em uma população base de pinhão manso.....	202
<b>Anexo D</b> – Sistema de cruzamento e parâmetros intra-familiares em uma população de pinhão manso. ....	205
<b>Anexo E</b> – Parâmetro de diversidade genética, com base no Índice de Shannon.....	205

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 3.1</b> - Folhas recém expandidas de pinhão manso utilizadas para a extração de ácidos nucleicos.....	49
<b>Figura 3.2</b> - Secção transversal da lâmina foliar de pinhão manso observada em microscopia de luz (ML) e eletrônica de transmissão (MET) .....	54
<b>Figura 3.3</b> - Visualização da qualidade do DNA genômico obtido de folhas de pinhão manso em eletroforese de gel 0,8% agarose. ....	56
<b>Figura 3.4</b> - Digestão de 1µg de DNA genômico obtido de folhas de pinhão manso. ....	57
<b>Figura 3.5</b> - Amplificação da região ITS. ....	58
<b>Figura 3.6</b> - Amplificação do loco <i>mJCENA41</i> microssatélites. ....	59
<b>Figura 3.7</b> - Amplificação do loco <i>mJCENA87</i> . ....	59
<b>Figura 3.8</b> - Amplificação do loco <i>JC613</i> . ....	60
<b>Figura 4.1</b> - Origem das populações de pinhão manso do banco de germoplasma da UFSCar.....	67
<b>Figura 4.2</b> - Região do DNA ribossomal amplificada por PCR pelos iniciadores ITS1 e ITS4 .....	68
<b>Figura 4.3</b> - Amplificação das regiões ITS de 14 haplótipos acessos utilizados no sequenciamento da região do rDNA. ....	72
<b>Figura 4.4</b> – Presença dos haplótipos nos diferentes países. ....	75
<b>Figura 4.5</b> - Restrição da região ITS pela endonuclease <i>EcoRV</i> . ....	76
<b>Figura 4.6</b> - Restrição da região ITS pela endonuclease <i>Hinfl</i> .....	76
<b>Figura 4.7</b> – Amplificação dos 14 haplótipos das regiões ITS.....	77
<b>Figura 4.8</b> - Alinhamento entre as sequencias polimórficas obtidas através do sequenciamento das regiões ITS do rDNA.....	80
<b>Figura 4.9</b> - Árvore filogenética para 14 haplótipos e controle.....	85
<b>Figura 5.1</b> - Controles realizados durante o desenvolvimento da biblioteca genômica enriquecida em microssatélites para pinhão manso. ....	96
<b>Figura 5.2</b> - Visualização da amplificação via PCR de 19 clones da placa 01.....	100

<b>Figura 5.3</b> - Porcentagem de microssatélites encontrados em relação à unidade repetitiva .....	101
<b>Figura 5.4</b> - Porcentagem de microssatélites encontrados em relação a classe.....	102
<b>Figura 6.1</b> - Padrão de amplificação gerado pelo loco <i>mJCENA87</i> . .....	120
<b>Figura 6.2</b> - Padrão de amplificação gerado pelo loco <i>JC116</i> .....	120
<b>Figura 6.3</b> - Padrão de amplificação gerado pelo loco <i>mJCENA27</i> . .....	121
<b>Figura 6.4</b> - Padrão de amplificação gerado pelo loco <i>mJCENA41</i> . .....	121
<b>Figura 6.5</b> - Padrão de amplificação gerado pelo loco <i>mJCENA47</i> . .....	122
<b>Figura 6.6</b> - Padrão de amplificação gerado pelo loco <i>mJCENA63</i> . .....	122
<b>Figura 6.7</b> - Gráfico de dispersão obtido na análise de coordenadas principais para 51 acessos de pinhão manso .....	132
<b>Figura 6.8</b> - Gráfico de dispersão obtido na análise de coordenadas principais para os acessos de pinhão manso do continente americano .....	133
<b>Figura 6.9</b> - Gráfico de dispersão obtido na análise de coordenadas principais para os acessos brasileiros de pinhão manso .....	134
<b>Figura 6.10</b> - Representação gráfica da análise de agrupamento .....	136
<b>Figura 7.1</b> - Padrão de amplificação gerado pelo marcador TRAP ( <i>JC001F + P4</i> ) .....	151
<b>Figura 7.2</b> - Padrão de amplificação gerado pelo marcador TRAP ( <i>JC010F + P3</i> ). .....	151
<b>Figura 7.3</b> - Padrão de amplificação gerado pelo marcador TRAP ( <i>JC011F + P3</i> ). .....	152
<b>Figura 7.4</b> - Parentesco entre 51 populações baseadas no marcador TRAP. ....	155
<b>Figura 7.5</b> - Padrão de amplificação gerado pelo marcador TRAP ( <i>Geranyl + P5</i> ). .....	157
<b>Figura 7.6</b> – Sequência nucleotídica obtida a partir da amplificação.....	158
<b>Figura 8.1</b> – Característica da inflorescência do pinhão manso. ....	168
<b>Figura 8.2</b> - Padrão de amplificação gerado pelo iniciador <i>mJCENA87</i> .....	176
<b>Figura 8.3</b> - Padrão de amplificação gerado pelo iniciador <i>mJCENA108</i> .....	176

**Figura 8.4** - Padrão de amplificação gerado pelo iniciador *mJCENA111*..... 177



## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	21
1.1	Objetivos .....	22
1.2	Hipóteses .....	22
2.	REVISÃO DE LITERATURA .....	23
2.1	Aspectos botânicos do pinhão manso.....	23
2.2	O pinhão manso como uma cultura energética .....	25
2.3	Distribuição do pinhão manso .....	25
2.4	Recursos genéticos vegetais .....	26
2.5	Marcadores moleculares.....	27
2.5.1	Marcadores ITS .....	27
2.5.2	Marcadores Microsatélites.....	28
2.5.3	Marcadores TRAP.....	30
2.6	Determinação do sistema reprodutivo.....	31
	REFERÊNCIAS .....	34
3.	PRESERVAÇÃO DE TECIDOS FOLIARES DE PINHÃO MANSO PARA EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO .....	44
	Resumo .....	44
	Abstract.....	45
3.1	Introdução.....	46
3.2	Material e Métodos.....	47
3.2.1	Materiais vegetais.....	47
3.2.2	Microscopia de Luz (ML) e Eletrônica de Transmissão (MET).....	48
3.2.3	Extração de DNA .....	49
3.2.4	Qualidade e restrição de DNA genômico.....	50
3.2.5	Quantificação do DNA genômico .....	50
3.2.6	Amplificação e análise das regiões ITS .....	50
3.2.7	Amplificação e análise de microsatélites.....	51
3.3	Resultados e Discussão .....	51
3.4	Conclusão .....	60
	Referências .....	60
4.	RELAÇÕES GENÉTICAS ENTRE POPULAÇÕES DE PINHÃO MANSO BASEADAS NAS REGIÕES ITS .....	64
	Resumo .....	64
	Abstract.....	64
4.1	Introdução.....	66
4.2	Material e Métodos.....	67
4.2.1	Material Vegetal.....	67
4.2.2	Extração e quantificação do DNA.....	68
4.2.3	Amplificação e análise das regiões ITS .....	68
4.2.4	Análise dos dados.....	71
4.2.5	Seqüenciamento da região ITS.....	69
4.3	Resultados e Discussão .....	71
4.4.1	Seqüenciamento das regiões ITS.....	76
4.4	Conclusão .....	86
	Referências .....	86
5.	DESENVOLVIMENTO DE INICIADORES MICROSSATÉLITES PARA <i>Jatropha curcas</i> (EUPHORBIACEAE) E SUA TRANSFERIBILIDADE PARA CONGÊNERES .....	89
	Resumo .....	89

Abstract.....	89
5.1 Introdução.....	91
5.2 Material e Métodos.....	92
5.2.1 Materiais vegetais.....	92
5.2.2 Construção da biblioteca genômica enriquecida.....	94
5.2.3 Clonagem dos fragmentos selecionados.....	96
5.2.4 Isolamento do DNA Plasmidial por Lise Alcalina.....	97
5.2.5 Seqüenciamento dos clones positivos para microssatélites.....	98
5.2.6 Construção dos microssatélites.....	98
5.2.7 Validação dos iniciadores.....	99
5.2.8 Transferibilidade dos iniciadores.....	99
5.3 Resultados e Discussão.....	99
5.3.1 Biblioteca genômica enriquecida com microssatélites.....	99
5.3.2 Validação dos iniciadores.....	103
5.2.3 Transferibilidade dos iniciadores.....	106
5.4 Conclusão.....	109
Referências.....	109
<b>6. CARACTERIZAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE <i>Jatropha curcas</i> L., REVELADOS POR MARCADORES MICROSSATÉLITES.....</b>	<b>114</b>
Resumo.....	114
Abstract.....	115
6.1 Introdução.....	116
6.2 Material e Métodos.....	117
6.2.1 Material Vegetal.....	117
6.2.2 Extração e quantificação do DNA.....	118
6.2.3 Amplificação do DNA.....	118
6.2.4 Análises dos dados.....	118
6.3 Resultados e Discussão.....	119
6.3.1 Diversidade genética.....	119
6.3.2 Estrutura genética.....	127
6.3.3 Impactos na conservação e melhoramento genético.....	138
6.4 Conclusões.....	138
Referências.....	138
<b>5. CARACTERIZAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA EM PINHÃO MANSO UTILIZANDO MARCADORES MOLECULARES ASSOCIADOS A CARACTERÍSTICAS DAS SEMENTES.....</b>	<b>142</b>
Resumo.....	142
Abstract.....	143
7.1 Introdução.....	144
7.2 Material e Métodos.....	145
7.2.1 Material Vegetal.....	145
7.2.2 Extração e quantificação do DNA genômico.....	145
7.2.3 Marcadores Moleculares TRAPs.....	146
7.2.4 Clonagem e seqüenciamento do gene específico.....	146
7.2.5 Análises estatísticas.....	148
7.3 Resultados e Discussão.....	148
7.3.2 Seqüenciamento do gene específico.....	156
7.4 Conclusões.....	158
Referências.....	159

8.	<i>Jatropha curcas</i> L. EXIBE UM SISTEMA MISTO DE REPRODUÇÃO, ALTA TAXA DE CRUZAMENTOS CORRELACIONADOS E APOMIXIA .....	165
	Resumo .....	165
	Abstract.....	166
8.1	Introdução.....	167
8.2	Material e Métodos.....	169
8.2.1	Local do estudo .....	169
8.2.2	Amostragem .....	170
8.2.3	Extração e quantificação do DNA.....	170
8.2.4	Amplificação do DNA .....	171
8.2.5	Análises dos dados .....	172
8.3	Resultados e Discussão .....	175
8.3.1	Análise da diversidade genética e endogamia.....	175
8.3.4	Implicações para conservação e melhoramento genético .....	183
8.4	Conclusão .....	184
	Referências .....	184
	ANEXOS .....	190



## 1. INTRODUÇÃO

A bioenergia desponta como alternativa para reduzir o consumo do petróleo, além de reduzir os problemas ambientais e favorecer a agricultura. O biodiesel surgiu como uma alternativa ao óleo diesel e se destacou durante a década passada por ser um combustível renovável e biodegradável. Países como Alemanha, EUA, Brasil, Áustria, França, Itália, China e Índia, têm testado e avaliado o uso do biodiesel em larga escala.

Para a produção do biodiesel, mais de 60 espécies vegetais têm sido avaliadas quanto à qualidade do óleo, produtividade e aproveitamento de resíduos. O pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) tem se destacado dentre as demais oleaginosas por ser perene, possuir alto conteúdo de óleo de qualidade nas sementes, resistência à seca e inicialmente por apresentar baixo custo de produção.

O pinhão manso é uma espécie nativa das Américas, tendo sido introduzida em diversas regiões dos trópicos e subtropicais. Estima-se que mais de três milhões de hectares de pinhão manso já foram implantados, destacando-se países como a China, Índia e o Brasil como maiores produtores. Contudo, mais recentemente houve uma desaceleração na implantação de lavouras de pinhão manso, pois a falta de pesquisa básica na cultura estaria desestimulando o cultivo. A exploração do pinhão manso para produção de biodiesel tem se esbarado na baixa produtividade das lavouras devido à inexistência de cultivares melhoradas geneticamente.

Em 2005, foi implantado um banco de germoplasma de pinhão manso na Universidade Federal de São Carlos, Araras, SP, abrigando acessos brasileiros de diversos Estados, além de acessos do Paraguai, México, Colômbia, República Dominicana, Tanzânia, Camboja e variedades melhoradas para teor de óleo da China. Contudo, não se conhecem as relações entre os acessos, tornando a caracterização genética essencial para a condução e sucesso de programas de melhoramento genético da espécie, podendo assegurar informações sobre as fontes de genes e sua utilização futura.

## 1.1 Objetivos

Caracterizar a variabilidade genética dos acessos de pinhão manso depositados no banco de germoplasma de pinhão manso da Universidade Federal de São Carlos estudando a diversidade e estrutura genética com o auxílio de marcadores moleculares, além de determinar o sistema reprodutivo em uma população base, utilizando marcadores microssatélites.

## 1.2 Hipóteses

- A coleção de germoplasma de pinhão manso a ser avaliada apresenta elevada diversidade genética, pois possui acessos provenientes de diversos países;
- Os acessos brasileiros apresentam maior diversidade por estar contido no centro de diversidade da espécie;
- O isolamento reprodutivo pode ter contribuído para o aumento da distância genética entre os acessos de outras partes do mundo e os brasileiros;
- A espécie apresenta sistema reprodutivo misto, pois existem plantas isoladas produzindo sementes viáveis.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Aspectos botânicos do pinhão manso

O pinhão manso pertence à família Euphorbiaceae que compreende 320 gêneros e cerca de 8000 espécies, distribuídas pelo mundo (WEBSTER, 1994). O gênero *Jatropha* contém cerca de 175 espécies conhecidas (HELLER, 1996). O centro de origem do gênero *Jatropha* ainda é incerto, mas acredita-se que seja originário das Américas e o Brasil aparece como centro de diversidade geográfica, pois muitas espécies encontram-se distribuídas pelo país (HENNING; MITZLAFF, 1995; HELLER, 1996). Na atualidade, o pinhão manso também se encontra disperso pela Ásia, África e Oceania (YAOWALAK et al., 2011).

Dentre as principais espécies destacam-se: *Jatropha curcas* L. (pinhão manso), *J. elliptica*, *J. gossypifolia*, *J. mollissima*, *J. multifida*, *J. podagrica* e *J. weddeliana*. Entretanto, somente o pinhão manso produz sementes com interesse comercial para produção de óleo ou para uso medicinal (SUNITA et al., 2005; SUDHEER PAMIDIMARRI et al., 2009ab). Muitas espécies apresentam apenas valor ornamental, devido à variabilidade de tipos e formas de flores, folhas e caules (HELLER, 1996).

Linnaeus (1753) foi o primeiro autor a nomear o pinhão manso como *Jatropha curcas* em *Species Plantarum* (HELLER, 1996). O pinhão manso sempre despertou o interesse humano devido às características do óleo que produz, destacando-se a não emissão de fumaça, cheiro, ser impróprio para o consumo animal e de grande poder de combustão (SUJATHA; DHINGRA, 1993).

Segundo Câmara e Heiffig (2006), o pinhão manso apresenta a seguinte descrição botânica: arbusto grande de crescimento rápido, podendo atingir três metros de altura, caule liso, com diâmetro aproximado de 20 cm, lenho mole e medula desenvolvida, mas pouco resistente; as folhas são verdes esparsas e brilhantes, largas e alternadas, em forma de palma com três a cinco lóbulos e pecioladas. A espécie é monóica, cujas flores femininas apresentam três células elípticas, ovário com três carpelos, cada um com um lóculo que produz um óvulo com três estigmas bifurcados e separados, enquanto que, as masculinas possuem dez estames, sendo mais numerosas e situadas nas pontas das ramificações (SATURNINO et al., 2005). Na inflorescência do pinhão manso pode-se observar que as flores femininas variam de cinco a vinte e que essas abrem em dias diferentes. A flor feminina da primeira bifurcação do cacho abre

antes, depois vão se abrindo as situadas acima da primeira, o que força a polinização cruzada ou xenogâmica (SATURNINO et al., 2005; JUHÁSZ, et al., 2009). Raju e Ezradanam (2002) estudaram a frutificação do pinhão manso e relataram que em uma inflorescência a proporção de flores femininas é de 1-5 flores para 25-93 masculinas e que a abertura ocorre pela manhã e a deiscência da antera ocorre uma hora após a abertura da flor. Os estigmas tornam-se receptíveis depois que a flor se abre e permanecem assim por três dias. Já as flores não polinizadas caem no quarto dia, enquanto as polinizadas permanecem, onde as sépalas e pétalas aumentam gradualmente para protegerem o fruto até que alcance seu máximo desenvolvimento (SATURNINO et al., 2005). Quanto aos polinizadores, Raju e Ezradanam (2002) observaram que na base das flores femininas e masculinas existem glândulas elípticas produtoras de néctar favorecendo assim a polinização entomófila. Os principais polinizadores são abelhas (*Apis mellífera*), moscas, tripes e formigas (SATURNINO et al., 2005; RAJU; EZRADANAM, 2002).

Segundo Aker (2007), o desenvolvimento do fruto é do tipo das Euphorbiaceas como a mandioca, mamona e seringueira, onde os frutos fecundados continuam a crescer depois da maturação dos primeiros frutos de um cacho. Os frutos são do tipo cápsula trilocular, carnudos e amarelados quando maduros, contendo três sementes (SATURNINO et al., 2005). O fruto compõe-se de 27,8% de casca, 26,2% de epicarpo e 46% de albúmem e é nesta região onde se encontra o maior teor de óleo, podendo chegar a 60,8% (BRASIL, 1985). O pinhão manso é uma planta de ciclo perene que pode produzir de 1 a 6 toneladas de óleo por hectare dependendo da idade da planta, começando a produzir aos 10 meses e atingindo a sua plenitude de produção por volta do quarto ano, podendo chegar aos 50 anos produzindo (PEIXOTO, 1973).

O pinhão manso apresenta raízes bem desenvolvidas, sendo a raiz principal pivotante e em solos com baixa densidade a raiz pode chegar ao dobro do comprimento da parte aérea (YE et al., 2009). A planta aborta suas folhas sob déficit hídrico ou frio, e geralmente ocorre a frutificação anual. Araújo e Ribeiro (2008) observaram, em condições brasileiras, que a queda foliar ocorreu durante o período de estiagem e a produção de frutos maduros concentra-se de fevereiro a maio. Contudo, as informações agronômicas sobre a cultura ainda são escassas principalmente com relação ao desenvolvimento de cultivares comerciais, ataques de pragas e patógenos, entre outros fatores que podem influenciar na produtividade agrícola (KANT; WU, 2011).

## 2.2 O pinhão manso como uma cultura energética

A busca por óleos para produção de biocombustíveis despertou interesse por várias oleaginosas, dentre as quais o pinhão manso, que passou a ser considerado como cultura candidata. Durães e Laviolla (2009) destacam que o pinhão manso se tornou uma matéria prima atrativa para a produção de biodiesel por apresentar elevado potencial de rendimento de grãos e óleo, pois a produtividade do pinhão manso pode ser de três a quatro vezes superior a da soja.

O pinhão manso se destaca também por ser uma cultura não alimentar por possuir compostos tóxicos como os ésteres de forbol, ou seja, seu óleo é destinado à produção de biocombustível. A espécie também possui características compatíveis com a agricultura familiar, pois é perene, altamente dependente de mão de obra, além de permitir o consórcio com outras culturas. Ye et al. (2009) apontam que o pinhão manso é uma planta versátil com certos atributos econômicos e ecológicos, pois o balanço de água é favorável ao solo, uma vez que o índice de área foliar da planta é alto, promovendo alta taxa de transpiração, porém diminuindo a evaporação, retendo maior quantidade de água no solo.

No entanto, existem alguns desafios técnicos e científicos para a inserção do pinhão manso na matriz energética brasileira como a tecnologia de produção e produtividade da cultura, necessidade de conhecimentos científicos, qualidade do óleo vegetal e aproveitamento da torta para a alimentação animal (DURÃES; LAVIOLLA, 2009).

## 2.3 Distribuição do pinhão manso

O pinhão manso é uma planta nativa das Américas, porém foi introduzido por navegadores portugueses em 1783 nas ilhas do Arquipélago de Cabo Verde, alcançando a África, e posteriormente a Ásia (DURÃES; LAVIOLLA, 2009). O pinhão manso é encontrado nas regiões tropicais, temperadas e frias, sendo cultivado no Brasil, Nicarágua, México, Cuba, Índia, China, Cabo Verde, Irlanda, Alemanha, Madagascar, Malásia, Tailândia, Filipinas, dentre outros países (HELLER, 1996).

Segundo estimativa do WWF (2008) as maiores áreas de cultivo do pinhão manso encontram-se na Ásia (85%), seguido da África (13%) e América (2%). No

Brasil, os principais estados onde se cultivam o pinhão manso são: Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Goiás, Tocantins, Ceará, Piauí, Bahia, Minas Gerais e São Paulo (DURÃES; LAVIOLLA, 2009). Estima-se que já foram implantados 50 mil hectares de lavouras comerciais no Brasil (ROSADO et al., 2010). Contudo, os desafios técnicos e científicos são as maiores limitações da cultura, pois a falta de cultivares melhoradas para a implantação das lavouras tem provocado o fechamento de grandes projetos que utilizaram o pinhão manso como matéria-prima para a produção de biocombustível (SANDERSON, 2009; KANT; WU, 2011).

#### **2.4 Recursos genéticos vegetais**

A pesquisa em recursos genéticos e melhoramento vegetal é uma das atividades mais relevantes para o país, tendo produzido resultados que contribuíram significativamente para os principais ganhos qualitativos e quantitativos alcançados pela agricultura brasileira nos últimos anos (QUEIROZ; LOPES, 2007). O processo de melhoramento genético é altamente dependente da amplitude da base genética disponível, que por sua vez é influenciada pelo acervo de recursos úteis disponíveis, na forma de materiais coletados e caracterizados, mantidos nos bancos de germoplasma, que são a base para o desenvolvimento de cultivares (FERREIRA et al., 2007). Os trabalhos com recursos genéticos vegetais envolvem uma série de atividades como a introdução, coleta, caracterização, avaliação, documentação, conservação e utilização do germoplasma (VENCOVSKY et al., 2007).

Segundo Allard (1970), a variabilidade genética disponível nas espécies é reconhecidamente ampla, tanto entre quanto dentro das populações, e cada espécie pode apresentar milhares de variantes; portanto é razoável admitir que uma coleção de germoplasma, por maior que seja, é apenas uma pequena amostra da variabilidade total.

A variabilidade genética pode exercer um papel decisivo na sobrevivência das espécies, principalmente quando ocorrem alterações no ambiente determinando o sucesso na restauração ecológica (ELLSTRAND; ELLAN, 1993). Desta forma, a caracterização da diversidade genética proporciona o melhor conhecimento do germoplasma disponível, além de ser essencial para as etapas posteriores de desenvolvimento de materiais elites e para o desenvolvimento de estratégias de conservação da espécie.

A diversidade genética tem sido avaliada classicamente por meio da análise do fenótipo do organismo, e nas plantas, pela mensuração de características agromorfológicas. A diversidade genética pode também ser avaliada pela mensuração da variação molecular, especificamente de seqüências de moléculas que carregam informações genéticas, como o DNA (FERREIRA et al., 2007).

A detecção de polimorfismo de sequência de DNA entre acessos de uma coleção de germoplasma é revelada por técnicas que permitem a detecção de mutação de ponto, como inserção e deleção na região do genoma analisada. Essas técnicas são conhecidas como marcadores moleculares, pois, além de revelarem polimorfismo de sequência de DNA entre os acessos estudados, o sítio do genoma pode ser também utilizado como ponto de referência no cromossomo, extremamente útil em diferentes estudos genéticos como mapeamento, genômica comparativa e isolamento de genes (FERREIRA et al., 2007).

## **2.5 Marcadores moleculares**

Os marcadores moleculares podem ser definidos como qualquer fenótipo molecular derivado de um polimorfismo de sequência de DNA, referente a um sítio conhecido ou anônimo do genoma (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). Para que um marcador molecular seja considerado um marcador genético ele deve possuir um comportamento mendeliano, onde os alelos de cada loco segregam na meiose e que os alelos de locos distintos são herdados de forma independente (FERREIRA et al., 2007).

Vários tipos de marcadores moleculares estão disponíveis para analisar a diversidade genética, onde cada método oferece tipos diferentes de informação. Sendo assim, a escolha do método apropriado vai depender da pergunta biológica que se pretende responder.

### **2.5.1 Marcadores *Internal Transcribed Spacer* (ITS) do gene ribossomal (rDNA)**

O DNA ribossomal (rDNA) é a região do genoma que codifica os componentes do RNA dos ribossomos (rRNA). O loco do rDNA é constituído por três genes (18S, 5,8S e 25S), que codificam o rDNA final e dois espaçadores transcritos mas não

codificadores (ITS1 e ITS2) (BOONRUANGROD et al., 2009). Estima-se que o número de conjunto de genes para rRNA em milho (*Zea mays* L.) varie entre 3.000 e 9.000 cópias (GRAUR; LI, 2000).

Em geral, as regiões codificadoras de rDNA evoluem lentamente e são altamente conservadas, possibilitando a sua utilização em níveis hierárquicos mais elevados (COOKE et al., 2000). Já os espaçadores internos transcritos (ITS – *Internal Transcribed Spacer*) evoluem rapidamente, apresentando alto polimorfismo, o que os tornam interessantes nos estudos filogenéticos de gêneros e espécies (BALDWIN et al., 1995; FERREIRA; SOUZA-CHIES, 2005). As muitas cópias do rDNA são mantidas similares entre si através do processo chamado evolução em concerto (ALVAREZ; WENDEL, 2003). A evolução em concerto é um processo biológico abrangente, onde a maioria das famílias gênicas repetitivas estudadas até o momento sofre sua ação, que se dá através dos mecanismos de recombinação do DNA, reparo e replicação, como o *crossing over* desigual, entre as unidades de repetição e conversão gênica (ALVAREZ; WENDEL, 2003). Entretanto, existem registros em que o rDNA não evolui em concerto e que algumas cópias podem divergir, tornando-se pseudogenes (HARPKE; PETERSON, 2006). A não homogeneização das cópias pode ser detectada pelo alto conteúdo de adenina e timina nas sequências, taxas elevadas de substituição e grande número de *indels* em motivos estruturais conservados e estrutura do RNA com menor estabilidade termodinâmica (HARPKE; PETERSON, 2006).

A amplificação, restrição e seqüenciamento da região ITS têm sido utilizadas com sucesso para a caracterização da diversidade genética, análises filogenéticas e estudos taxonômicos (HSIAO et al., 1994; AKAGI et al., 1997; CORDEIRO et al., 2003; NWAKANMA et al., 2003; SHU-PING et al., 2007; BECHARA et al., 2010; FUKUNAGA et al., 2011). Para o pinhão manso, Sudheer Pamidimarri et al. (2009a) utilizaram sequências do DNA ribossomal (ITS) para analisar filogeneticamente o gênero *Jatropha*.

### **2.5.2 Marcadores Microsatélites**

O desenvolvimento dos marcadores microsatélites (SSR) permitiu o uso mais consistente dos marcadores moleculares, pois apresentam maior conteúdo informativo por loco gênico entre todas as classes de marcadores, além de avaliar rapidamente um

grande número de indivíduos para um grande número de locos em pouco tempo (WU; TANKSLEY, 1993; GRATAPAGLIA, 2001).

Os marcadores microssatélites são os que mais se aproximam do método ideal para os estudos de genética de populações, constituindo uma ferramenta útil na análise populacional, construção de mapas genéticos, análise de paternidade, fluxo gênico, diagnósticos de doenças, estudos ecológicos e biologia da conservação (CHASE et al., 1996; RAFALSKI et al., 1996). Os microssatélites consistem de seqüências curtas de 1 a 6 nucleotídeos repetidas em linha (*tandem*), encontrados freqüentemente e aleatoriamente em todos os DNAs nucleares eucarióticos examinados (OLIVEIRA et al., 2006). São considerados ideais para estudos em plantas por possuírem características desejáveis, como distribuição ao acaso, codominância dos alelos, locos multialélicos, amplificados via PCR e uma vez desenvolvidos os iniciadores, estes podem ser compartilhados entre as instituições de pesquisa (SUGANUMA; CIAMPI, 2009).

Segundo Eisen (1999), os microssatélites apresentam alta taxa de mutação, variando de  $10^{-6}$  a  $10^{-2}$  por geração, sendo que a maioria das mutações são ocasionadas por alterações no número das unidades repetitivas. Acredita-se que a instabilidade surge através de um mecanismo específico de mutação chamado *slippage* (deslizamento) da DNA polimerase que ocorre durante a replicação do DNA e conduz ao aumento ou à diminuição do número de repetições. Outro motivo pela qual a taxa de mutação é alta nos microssatélites é devido ao fenômeno de *crossing-over* desigual, causado pelo pareamento errôneo destas seqüências durante os quiasmas.

A distribuição preferencial nas regiões não codificadoras protege os microssatélites da ação da seleção natural, tornando-os seletivamente neutros e muito úteis para os estudos de genética de populações (EISEN, 1999). A desvantagem resulta do custo para a identificação dos microssatélites e para desenvolver iniciadores específicos (CHEN, 1997).

Para o desenvolvimento de iniciadores específicos, pode ser empregada a técnica de bibliotecas genômicas (SNUSTAD; SIMMONS, 2001). Entretanto, as mesmas podem resultar em baixa eficiência, pois o número de clones contendo microssatélites pode variar de 0,04% a 12% (ZANE et al., 2002). A técnica mais utilizada para isolamento de microssatélites e que resulta em maior eficiência é o método de bibliotecas enriquecidas, tais como as descritas por Kijas et al. (1994) e Billote et al. (1999).

Os métodos de enriquecimento oferecem maior eficiência na captura de microssatélites devido à obtenção de grandes quantidades de clones contendo regiões em *tandem* (BILLOTE et al., 1999). Vários grupos de plantas de interesse agrônômico tiveram seus iniciadores de microssatélites desenvolvidos a partir de bibliotecas genômicas enriquecidas, como eucalipto (BRONDANI et al., 1998), cana-de-açúcar (CORDEIRO et al., 2000), arroz (BRONDANI et al., 2001), palmito (GAIOTTO et al., 2001), banana (CRESTE et al., 2003, 2006) e feijão (CARDOSO et al., 2008). Outra metodologia estratégica para o desenvolvimento de marcadores microssatélites é a obtenção de Etiquetas de Sequências Expressas (ESTs), sendo utilizada para cana-de-açúcar (FIGUEIREDO et al., 2001), eucalipto (FALCÃO et al., 2004) e café (PINTO, 2006). Gomes (2009) identificaram ESTs relacionadas com as vias de biossíntese de ácidos graxos, para gerar marcadores de DNA e mapear genes estrategicamente ligados ao desenvolvimento das sementes do pinhão manso.

Devido ao alto grau de polimorfismo, os microssatélites têm sido empregados com sucesso em diferentes situações da área vegetal, como os estudos do sistema reprodutivo, fluxo gênico e estrutura genética em *Pithecellobium elegans* (CHASE et al., 1996), *Caryocar brasiliense* (COLLEVATTI et al., 2001), *Euterpe edulis* (GAIOTTO et al., 2003), *Eugenia dysenterica* (ZUCCHI et al., 2003), *Theobroma grandiflorum* (ALVES et al., 2003), *Oryza glumaepatula* (KARASAWA et al., 2007ab), *Theobroma cacao* (SILVA et al., 2011).

### **2.5.3 Marcadores *Target Region Amplified Polymorphism* (TRAP)**

Hu e Vick (2003) desenvolveram uma técnica rápida e eficiente baseada em PCR, que utiliza ESTs para gerar marcadores polimórficos ao redor de genes candidatos alvos. Este marcador denominado de polimorfismo de amplificação de regiões alvo (TRAP) utiliza dois iniciadores para gerar nucleotídeos, sendo um dos iniciadores fixo desenhado a partir de uma sequência alvo de interesse a partir de ESTs, amplificando sequências parciais do gene candidato, e o segundo, arbitrário, com 3 a 4 nucleotídeos rico em AT ou GC em seu núcleo, para anelar com *introns* e *exons*, amplificando as demais regiões do gene candidato. A reação de amplificação por PCR geralmente produz fragmentos de DNA entre aproximadamente 50-1000 pb que devem ser separados por eletroforese em géis de 7% poliacrilamida.

Esta técnica tem sido utilizada tendo como alvos genes que governam características agronômicas de interesse e apresenta grande potencial, por agregar as vantagens: alta reprodutibilidade, simplicidade e capacidade de produzir padrão de bandas semelhantes à técnica de AFLP (HU; VICK, 2003). Hu et al. (2005) ressaltam que essa técnica é útil para a genotipagem de coleções de germoplasma e genes responsáveis por características agronômicas desejáveis em plantas cultivadas. Os mesmos autores estudando a diversidade genética em alface (*Lactuca sativa* L.) verificaram que a técnica TRAP foi eficiente para separar as cultivares, bem como o relacionamento evolutivo das espécies, sendo consistente com os resultados anteriores obtidos por outras técnicas, como RFLP.

A técnica TRAP tem sido aplicada com sucesso nos estudos de mapeamento do genoma do girassol (HU, 2006), bem como na diversidade genética de populações de cana-de-açúcar (ALWALA et al., 2006), em *Spinacia oleracea* L. (HU et al., 2007) e *Lactuca sativa* L. (SIMKO; HU, 2008).

## **2.6 Determinação do sistema reprodutivo**

As plantas são organismos sésseis, sendo assim, desenvolveram estratégias para alcançar o sucesso reprodutivo como flores e frutos capazes de atrair polinizadores e dispersores de sementes, para manter altos níveis de variação genética dentro das populações com pouca diferenciação genética entre as mesmas (HAMRICK; GODT, 1989; GHANZOUL, 2005). Assim, a estrutura genética das populações está intimamente relacionada ao fluxo gênico, que é definido como o movimento de genes em populações, incluindo assim o movimento dos gametas, propágulos e indivíduos que trocam genes (NEIGEL, 1997).

O fluxo gênico tem sido amplamente discutido devido à sua magnitude e influência na genética das populações, pois se contrapõe aos efeitos da deriva genética, permitindo a homogeneização das frequências alélicas. Em plantas, a transferência de genes pode ocorrer pelo movimento de organismos individuais (sementes, rizomas e estolões), como através do movimento de gametas (pólen) (ZUCCHI, 2002).

O fluxo gênico pode ser quantificado por métodos diretos e indiretos. A utilização de corantes, marcadores morfológicos e análise de paternidade fornecem informações recentes (diretas) sobre o fluxo gênico, enquanto que a análise da estrutura

genética de populações como as estimativas de  $F_{ST}$ , alelos privados e correlação espacial relacionam as trocas ocorridas durante a evolução da espécie (ZUCCHI, 2002).

Desta forma, abordagens mais precisas como a análise de paternidade, onde locos gênicos são utilizados para identificar o mais provável pai de um conjunto de candidatos, fornecem informações mais precisas sobre o sucesso reprodutivo dos indivíduos e a magnitude do fluxo gênico dentro de uma população (ROBLENDO-ARNUNCIO; GIL, 2005).

O sistema reprodutivo se destaca na determinação da variação existente entre espécies em relação à estrutura genética, pois afeta a composição gênica e a dinâmica das populações (RITLAND; JAIN, 1981). O sistema reprodutivo refere-se à forma como um indivíduo, população ou espécie transfere suas informações genéticas de uma geração para a outra, podendo ser assexuado ou sexuado. Na reprodução assexuada não existe a participação de gametas, porém a descendência é gerada a partir de tecidos de um único organismo somente por divisões mitóticas e, portanto, os indivíduos possuem a mesma constituição genética. A reprodução assexuada pode ser dividida em reprodução vegetativa ou apomítica.

Na reprodução sexuada, dois indivíduos produzem gametas que se fundem e formam um zigoto dando origem a uma descendência com diferentes genótipos (FINKELDEY, 2005). Em espécies sexuais, o sistema reprodutivo pode ser classificado como autogamia, alogamia ou misto (GOODWILLIE et al., 2005). A autogamia ocorre a partir da fusão gametas masculinos e femininos de uma mesma flor. Já a alogamia envolve o cruzamento entre diferentes indivíduos, bem como a transferência de pólen entre diferentes flores, que podem ser de uma mesma planta (gitonogamia) ou não. No sistema misto os dois processos anteriores são detectados, com predominância de um deles (GOODWILLIE et al., 2005). Além disso, a capacidade da espécie vegetal produzir flores contendo ambos os sexos (hermafroditismo), ou flores unissexuais no mesmo indivíduo (monoícia) ou indivíduos com sexos distintos (dioícia). As espécies dióicas só se reproduzem por alogamia, enquanto que nas monóicas, a separação entre os sexos dentro de um mesmo indivíduo, favorece a fertilização cruzada, mas não impede a autofecundação. Já nas plantas hermafroditas é possível ocorrer misturas de cruzamentos e autofecundação. Dessa forma, o modo de reprodução tem um efeito marcante na estrutura genética das populações (FINKELDEY, 2005).

O estudo do sistema reprodutivo nas plantas permite estimar a taxa de cruzamento entre indivíduos e determinar o modo de transmissão dos genes de uma

geração para outra, permitindo delinear estratégias que maximizem a amostragem da variabilidade genética e indicando modelos genético-estatísticos apropriados para o manejo racional dos recursos genéticos de uma espécie em programas de melhoramento e conservação genética (HAMRICK; LOVELLESS, 1986; BROWN, 1990; SEOANE et al., 2000).

O sistema reprodutivo pode ser avaliado através da observação dos cruzamentos, comportamento dos agentes polinizadores e biologia floral e dos resultados de experimentos de polinização controlada. Esses métodos fornecem indicações sobre o sistema reprodutivo de uma espécie, porém não permitem uma medida direta do sucesso reprodutivo das populações (PAIVA et al., 1994).

O sistema reprodutivo também pode ser avaliado por marcadores genéticos morfológicos, que teve seu auge nas décadas de 1950 a 1980 (SILVA et al., 2003). Os trabalhos eram basicamente limitados para as espécies de interesse econômico, nas quais os marcadores morfológicos estavam disponíveis (BROWN et al., 1989). Os estudos apresentavam a mesma metodologia utilizando um caráter monogênico, com heranças genéticas dominante, cujo fenótipo das duas classes fosse de fácil distinção. Essa forma de avaliação do sistema reprodutivo foi e é muito utilizada por apresentar baixo custo de implantação, fácil manipulação experimental e de análise dos dados (SILVA et al., 2003).

A substituição dos marcadores morfológicos por moleculares se deve pelas informações geradas sobre o genoma das plantas, pois permitem uma medida direta do sucesso reprodutivo de uma espécie (PAIVA et al., 1994). Com o desenvolvimento dos marcadores moleculares, diversos parâmetros passaram a ser estimados com sucesso, como sistema reprodutivo, padrões de cruzamento e a dinâmica dos processos microevolucionários (RITLAND; JAIN, 1981). Ritland (1983) afirma que o método mais preciso para estudar o sistema reprodutivo de uma espécie é obtido pelo exame de padrões de segregação de progênies derivadas de um genótipo materno conhecido. Sendo assim, um experimento feito com progênies de polinização aberta e seu respectivo genótipo materno genotipados com marcadores codominantes podem fornecer informações precisas quanto ao sistema reprodutivo de uma espécie (OLIVEIRA et al., 2002).

Diversas espécies brasileiras tiveram seu sistema reprodutivo estudados utilizando marcadores codominantes. Os marcadores isoenzimáticos foram utilizados nos estudos de *Genipa americana* (SEBBENN et al., 1998), *Cariniana legalis*

(SEBBENN et al., 2000), *Esenbeckia leiocarpa* (SEOANE et al., 2001), *Copaifera langsdorffii* (OLIVEIRA et al., 2002) e *Senna multijuga* (RIBEIRO; LOVATO, 2004). Os marcadores microssatélites foram utilizados nos estudos de *Caryocar brasiliense* (COLLEVATTI et al., 2001), *Theobroma grandiflorum* (ALVES et al., 2003), *Araucária augustifolia* (BITTENCOURT; SEBBENN, 2007) e *Theobroma cacao* (SILVA et al., 2011).

Para o pinhão manso, o sistema reprodutivo foi estudado por meio de medidas indiretas como observação dos cruzamentos, comportamento dos agentes polinizadores, morfologia e biologia floral e dos resultados de experimentos de polinização controlada (HELLER, 1996; RAJU; EZRADANAM, 2002; BHATTACHARYA et al., 2005; CHANG-WEI et al., 2007; JUHÁSZ et al., 2009; LUCENA et al., 2010; LUO et al., 2007; PEREIRA et al., 2011). Os autores relatam que o desenvolvimento dos frutos pode ocorrer por autofecundação, gitonogamia, porém a xenogamia é favorecida pela falta de sincronismo na abertura de flores femininas e masculinas na mesma inflorescência. Este padrão desuniforme de abertura das flores femininas e masculinas favorece a fecundação cruzada.

## REFERÊNCIAS

- AKAGI, H.; YOKOZEKI, Y.; INAGAKI, A.; FUJIMURA, T. Highly polymorphic microsatellites of Rice Consist of AT repeats, and a classification of closely related cultivars with these microsatellite loci. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 94, n. 1, p. 61-67, 1997.
- AKER, C. L. **Growth and reproduction of *Jatropha curcas* 1997**. Disponível em: <<http://www.jatropha.de/conferences/abstracts-Jatropha97.htm>>. Acesso em: 13 abr. 2007.
- ALLARD, R. W. **Princípios do melhoramento genético das plantas**. São Paulo: Edgard Blucher, 1970. 381 p.
- ALVAREZ, I.; WENDEL, J. F. Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. **Molecular Phylogenetic Evolution**, Detroit, v. 29, p.417-434, 2003.
- ALVES, R. M.; SEBBENN, A. M.; ARTERO, A. S.; CLEMENT, C.; FIGUEIRA, A. Mating system in natural population of *Theobroma grandiflorum* (Willd ex Spreng) Shumm. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 26, p. 373-379, 2003.

ALWALA, S.; SUAN, A.; ARRO, J. A.; VEREMIS, J. C.; KIMBENG, C. A. Target region amplification polymorphism (TRAP) for assessing genetic diversity in sugarcane germplasm collections. **Crop Science**, Madison, v. 46, p. 448-455, 2006.

ARAÚJO, E. C. E.; RIBEIRO, A. M. B. R. Avaliação fenológica do pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) no município de Teresina- PI. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PLANTAS OLEAGINOSAS, ÓLEOS, GORDURAS E BIODIESEL, 5., 2008, Lavras, MG. **Anais...** Lavras: UFLA, 2008. p. 1468-1476.

BALDWIN, B. G.; SANDERSON, M. J.; PORTER, J. M.; WOJCIECHOWSKI, M. F.; CAMPBELL, C. S.; DONOGHUE, M. J. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, St. Louis, v. 82, n. 2, p. 247-277, 1995.

BECHARA, M. D.; MORETZSOHN, M. C.; PALMIERI, D. A.; MONTEIRO, J. P.; BACCI JR, M.; MARTINS JR, J.; VALLS, J. F. M.; LOPES, C. R.; GIMENES, M. A. Phylogenetic relationships in genus *Arachis* based on ITS and 5.8S rDNA sequences. **BMC Plant Biology**, London, v. 10, p. 255, 2010.

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

BILLOTTE, N.; LAGODA, P. J. L.; RISTERUCCI, A. M.; BAURENS, F. C. Microsatellite – enriched libraries: applied methodology for the development of SSRs markers in tropical crops. **Fruits**, Paris, v. 54, n. 4, p. 277-288, 1999.

BITTENCOURT, J. V. M.; SEBBENN, A. M. Patterns of pollen and seed dispersal in a small fragmented population of the wind-pollinated tree *Araucaria angustifolia* in southern Brazil. **Heredity**, London, v. 99, p. 580-591, 2007.

BOONRUANGROD, R.; DESAI, D.; FLUCH, S.; BERENYI, M.; BURG, K. Identification of cytoplasmic gene-pools of *Musa acuminata* Colla and *Musa balbisiana* Colla and their hybrids by chloroplast and mitochondrial haplotyping. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 118, p. 43-55, 2008.

BRASIL. Ministério da Indústria e Comércio. **Produção de combustíveis líquidos a partir de óleos vegetais**. Brasília, DF, 1985. 364 p.

BRONDANI, R. P. V.; BRONDANI, C.; TARCHINI, R.; GRATTAPAGLIA, D. Development, characterization and mapping of microsatellite markers in *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla*. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 97, n. 5-6, p. 816-827, 1998.

BRONDANI, C. B.; RANGEL, P. H.; FERREIRA, M. E. Development and mapping of *Oryza glumaepatula* – derived microsatellite markers in the interspecific cross *Oryza glumaepatula* x *O. sativa*. **Hereditas**, Lund, v. 134, n. 1, p. 59-71, 2001.

BROWN, A. H. D. Genetic characterization of plant mating system. In: BROWN, A. H. D.; CLEGG, M. T.; KAHLED, A. L.; WEIR, B. S. (Ed.). **Plant population genetics, breeding and genetic resources**. Sunderland, MA: Sinauer, 1990. p. 145-162.

BROWN, A. H. D.; BURDON, J. J.; JAROSZ, A. M. Isozymes analysis of Plant Mating Systems. In: SOLTIS, D. E.; SOLTIS, P. S. (Ed.). **Isozymes in plant biology, advances in plant sciences**. Portland: Dioscorides Press, 1989. p. 73-86.

CÂMARA, G. M. S.; HEIFFIG, L. S. **Agronegócio de plantas oleaginosas: matérias-primas para biodiesel**. Piracicaba: LPV/ESALQ/USP, 2006. 256 p.

CARDOSO, J. M. K.; OBLESSUC, P. R.; CAMPOS, T.; SFORÇA, D. A.; CARBONELL, S. A. M.; CHIORATTO, A. F.; FORMIGHIERI, E. F.; SOUZA, A. P.; BENCHIMOL, L. L. New microsatellite markers developed from an enriched microsatellite common bean library. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 43, n. 7, p. 929-936, 2008.

CHANG-WEI, L.; KUN, L.; YOU, C.; YOUNG-YU, S. Floral display and breeding system of *Jatropha curcas* L. **Forestry Studies in China**, Beijing, v. 10, p. 114-119, 2007.

CHASE, M.; KESSELI, R.; BAWA, K. Microsatellite markers for population and conservation genetics of tropical trees. **American Journal of Botany**, New York, v. 83, n. 1. p. 51-57, 1996.

CHEN, X.; TEMNYKH, S.; XU, Y.; CHO, Y. G.; McCOUCH, S. R. Development of a microsatellite framework map providing genome-wide coverage in rice (*Oryza sativa* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 95, p. 553-567, 1997.

COLLEVATTI, R. G.; GRATTAPAGLIA, D.; HAY, J. D. High resolution microsatellite based analysis of the mating system allows the detection of significant biparental inbreeding in *Caryocar brasiliense*, an endangered tropical tree species. **Heredity**, London, v. 86, n. 1, p. 60-67, 2001.

COOKE, D. E. L.; DRENTH, A.; DUNCAN, J. M.; WAGELS, G.; BRASIER, C. M. A molecular phylogeny of *Phytophthora* and related oomycetes. **Fungal Genetics and Biology**, Amsterdam, v. 30, p. 17-32, 2000.

CORDEIRO, G. M.; TAYLOR, G. O.; HENRY, R. J. Characterization of microsatellite markers from sugarcane (*Saccharum* sp.) a highly polyploidy species. **Plant Science**, Amsterdam, v. 155, p. 161-168, 2000.

CORDEIRO, G. M.; YONG-BAO, P.; HENRY, R. J. Sugarcane microsatellites for the assessment of genetic diversity in sugarcane germplasm. **Plant Science**, Amsterdam, v. 165, n. 1, p. 181-189, 2003.

CRESTE, S.; TULMANN NETO, A.; SILVA, S. O.; FIGUEIRA, A. Genetic characterization of banana cultivars (*Musa* spp.) from Brazil using microsatellite markers. **Euphytica**, Wageningen, v. 132, n. 3, p. 259-268, 2003.

CRESTE, S.; BENATTI, T. R.; ORSI, M. R.; RISTERUCCI, A. M.; FIGUEIRA, A. Isolation and characterization of microsatellite loci from a commercial cultivar of *Musa acuminata*. **Molecular Ecology Notes**, Malden, v. 6, n. 2, p. 303-306, 2006.

DURÃES, F.; LAVIOLA, B. Pinhão manso: oleaginosa potencial para o biodiesel. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISA EM PINHÃO MANSO, 1., 2009, Brasília, DF. **Anais...** Brasília, DF: Embrapa Agroenergia, 2009. CD-ROM.

EISEN, J. A. Mechanistic basis for microsatellite instability. In: GOLDSTEIN, D. B.; SCHLÖTTERER, C. (Ed.). **Microsatellites: evolution and applications**. Oxford: Oxford University Press, 1999. p. 34-48.

ELLSTRAND, N. C.; ELAN, D. R. Population genetic consequences of small population sizes: implication for plant conservation. **Annual Review of Ecological Systematics**, Palo Alto, v. 24, p. 217-242, 1993.

FALCÃO, C. L. **Desenvolvimento e mapeamento de microssatélites derivados de ESTs em *Eucalyptos***. Brasília, DF: Embrapa Serviço de Informação, 2004. (Circular Técnica, 32).

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética**. 3. ed. Brasília, DF: EMBRAPA, CENARGEN, 1998. 220 p.

FERREIRA, T. F.; SOUZA-CHIES, T. Genetic diversity among *Paspalum* L. species (*Poaceae*) belonging to the *Notata* and *Linearia* groups based on restriction fragment length polymorphism analyses. **Genetica**, Dordrecht, v. 125, p. 133-140, 2005.

FERREIRA, M. E.; MORETZSOHN, M. C.; BUSO, G. S. C. Fundamentos de caracterização molecular de germoplasma vegetal. In: NASS, L. L. (Ed.). **Recursos genéticos vegetais**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007. p. 379-420.

FIGUEIREDO, R. C.; BRITO, M. S.; FIGUEIREDO, L. H. M.; QUIAPIN, A. C.; VITORELLI, P. M.; SILVA, L. R.; SANTOS, R. V.; MOLFETTA, J. B.; GOLDMAN, G. H.; GOLDMAN, M. S. H. Dissecting the sugarcane expressed sequence tag (SUCEST) database: unraveling flower-specific genes. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 24, n. 1-4, p. 77-84, 2001.

FINKELDEY, R. **An introduction to tropical forest genetics**. Göttingen, Germany: Georg-August University, Institute of Forest Genetics and forest Tree Breeding, 2005. 241 p.

FUKUNAGA, K.; ICHITANI, K.; KAWASE, M. rDNA polymorphism of foxtail millet (*Setaria italica* ssp. *italica*) landraces in northern Pakistan and Afghanistan and in its wild ancestor (*S. italica* spp. *viridis*). **Genetic Resource Crop Evolution**, Dordrecht, v. 58, p. 825-830, 2011.

GAIOTTO, F. A.; BRONDANI, R. P. V.; GRATTAPAGLIA, D. Microsatellite markers for heart of palm – *Euterpe edulis* and *E. oleraceae* Mart. (Arecaceae). **Molecular Ecology Notes**, Malden, v. 1, p. 86-88, 2001.

GAIOTTO, F. A.; GRATTAPAGLIA, D.; VENCOSKY, R. Genetic structure, mating system, and long-distance gene flow in Heart of Palm (*Euterpe edulis* Mar.). **Journal of Heredity**, Washington, DC, v. 94, n. 5, p. 399-406, 2003.

GHANZOUL, J. Buzzing as usual? Questioning the global pollination crisis. **Trends in Ecology and Evolution**, Cambridge, v. 20, p. 367-373, 2005.

GOMES, K. A. **Identificação de genes envolvidos na biossíntese de ácidos graxos e desenvolvimento de marcadores microssatélites no pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) visando sua utilização na produção de biodiesel.** 2009. 85 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, 2009.

GOODWILLIE, C.; KALISZ, S.; ECKERT, C. G. The evolutionary enigma of mixed mating systems in plants: occurrence, theoretical explanations, and empirical evidence. **Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics**, Palo Alto, v. 36, p. 47–79, 2005.

GRATTAPAGLIA, D. Marcadores moleculares em espécies florestais: *Eucalyptus* como modelo. In: NASS, L. L.; VALOIS, A. C. C.; MELO, I. S.; VALADARES-INGLIS, M. C. (Ed.). **Recursos genéticos e melhoramento: plantas.** Rondonópolis: Fundação MT, 2001. p. 967-1010.

GRAUR, D.; LI, H-W. **Fundamentals of molecular evolution.** 2. Ed. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, 2000, 481 p.

HAMRICK, J. L.; GODT, J. W. Allozyme diversity on plant species. In: BROWN, A. H. D.; CLEGG, M. J.; KAHLER, A. L.; WEIR, B. S. (Ed.). **Plant population genetics, breeding, and genetic resources.** Sunderland: Sinauer Associates, 1989. p. 43-63.

HAMRICK, J. L.; LOVELESS, M. D. Isozyme variation in tropical trees; procedures and preliminary results. **Biotropica**, Washington, DC, v. 8, p. 201-207, 1986.

HARPKE, D. PETERSON, A. Non-concerted ITS evolution in *Mammillaria* (*Cactaceae*). **Molecular Phylogenetic Evolution**, Amsterdam, v. 41, p.579-593, 2006.

HELLER, J. **Physic nut, *Jatropha curcas* L.:** promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. Rome: International Plant Genetic Resources Institute, 1996. 66 p.

HENNING, R.; MITZLAFF, K. Production und Nutzung von Purgieröl als Kraftstoff und Rohstoff für die lokale Seifenherstellung im Sahel. In: KRAUSE, R.; SCHELLERT, C. (Ed.). **Nachwachsende Rohstoffe aus den Tropen und Subtropen für die Tropen und Subtropen.** Witzenhäuser Hochschulwoche. Kasel: Witzenhäuser, 1995. p. 137-151. (Der Tropenlandwirt, Beiheft, 53).

HSIAO, C.; CHATERTTON, N. J.; ASAY, K. H.; JENSEN, K. B. Phylogenetic relationships of 10 grass species: an assessment of phylogenetic utility of internal transcribed spacer region in the nuclear ribosomal DNA in monocots. **Genome**, Ottawa, v. 37, n. 1, p. 112-120, 1994.

HU, J. Defining the sunflower (*Helianthus annuus* L.) linkage group ends with the Arabidopsis –type telomere sequence repeat-derive markers. **Chromosome Research**, London, v. 14, p. 535-548, 2006.

HU, J.; VICK, B. A. Target Region Amplification Polymorphism: A Novel Marker Technique for Plant Genotyping. **Plant Molecular Biology Reporter**, Heidelberg, v. 21, p. 289-294, 2003.

HU, J.; MOU B.; VICK, B. A. Genetic diversity of 38 spinach (*Spinacia oleracea* L.) germplasm accessions and 10 commercial hybrids assessed by TRAP markers. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v. 54, p. 1667-1674, 2007.

HU, J.; OCHOA, O. E.; TRUCO, M. J.; VICK, B. A. Application of the TRAP technique to lettuce (*Lactuca sativa* L.) genotyping. **Euphytica**, Wageningen, v. 144, p. 225–235, 2005.

KANT, P.; WU, S. The extraordinary collapse of Jatropha as a Global Biofuel. **Environmental Science & Technology**, Easton, v. 45, n. 17, p. 7114-7115, 2011. doi: 10.1021/es201943v.

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

KARASAWA, M. M. G.; VENCOVSKY, R.; SILVA, C. M.; ZUCCHI, M. I.; OLIVEIRA, G. C. X.; VEASEY, E. A. Mating system of Brazilian *Oryza glumaepatula* populations studied with microsatellite markers. **Annals of Botany**, Oxford, v. 99, p. 245-253, 2007a.

KARASAWA, M. M. G.; VENCOVSKY, R.; SILVA, C. M.; ZUCCHI, M. I.; OLIVEIRA, G. C. X.; VEASEY, E. A. Genetic structure of Brazilian wild rice (*Oryza glumaepatula* Steud., Poaceae) populations analyzes using microsatellite markers. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 30, n. 2, p. 400-410, 2007b.

KIJAS, J. M.; FOWLER, J. C.; GARBETT, C. A.; THOMAS, M. R. Enrichment of microsatellites from the citrus genome using biotinylated oligonucleotide sequences bound to streptavidin coated magnetic particles. **Biotechniques**, Natick, v. 16, n. 4, p. 656-662, 1994.

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

LUCENA, A. M. A.; ARRIEL, N. H. C.; FREIRE, M. A. O. F.; ALBUQUERQUE, F. A.; ANDRADE, J. R.; BELTRÃO, N. E. M. Descrição do padrão de floração do pinhão manso. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA, 4.; SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE OLEAGINOSAS ENERGÉTICAS, 1., 2010, João Pessoa, PB. **Inclusão social e energia; Anais...** Campina Grande: Embrapa Algodão, 2010. p. 1681-1688.

NEIGEL, J. E. A comparison of alternative strategies for estimating gene flow from genetic markers. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Palo alto, v. 28, p. 105-128, 1997.

NWAKANMA, D. C.; PILLAY, M.; OKOLI, E. B.; TENKOUANO, A. PCR-RFLP of the ribosomal DNA internal transcribed spacers (ITS) provides markers for the A and B genomes in *Musa* L. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 108, n. 1, p. 154-159, 2003.

OLIVEIRA, A. F.; CARVALHO, D.; ROSADO, S. C. S. Taxa de cruzamento e sistema reprodutivo de uma população natural de *Copaifera langsdorffii* Desf. na região de Lavras (MG) por meio de isoenzimas. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 25, p. 331-338, 2002.

OLIVEIRA, E. J. **Desenvolvimento e uso de marcadores microssatélites para construção e integração de mapas genéticos de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis Sims f. flavicarpa* Deg.)**. 2006. 152 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

OLIVEIRA, E. J.; PÁDUA, J. G.; ZUCCHI, M. I.; VENCOVSKY, R.; VIEIRA, M. L. C. Origin, evolution and genome distribution of microssatélites. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 29, p. 294-307, 2006.

PAIVA, J. R.; KAGEYAMA, P. Y.; VENCOVSKY, R. Genetic of rubber tree (trees (*Hevea brasiliensis* (Willd. Ex. ADR. De Juss.) Müeller Arg.). 2. Mating system. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 43, p. 373-376, 1994.

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

PEREIRA, J. C. S.; FIDELIS, R. R.; ERASMO, E. A. L.; SANTOS, P. M.; BARROS, H. B.; CARVALHO, G. L. Florescimento e frutificação de genótipos de pinhão manso sob doses de fósforo no cerrado da região sul do Tocantins. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, Gurupi, Tocantins, v. 2, n. 1, p. 28-36, 2011.

PINTO, F. O. **Associação de marcadores EST-SSR à resistência ao bicho-mineiro em cafeeiros**. 2006. 71 p. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical) – Instituto Agrônomo de Campinas, Campinas, 2006.

QUEIROZ, M. A.; LOPES, M. A. Importância dos recursos genéticos vegetais para o agronegócio. In: NASS, L. L. (Ed.) **Recursos genéticos vegetais**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007. p. 61-119.

- RAFALSKI, J. A.; MORGANTE, M.; POWELL, W.; VOGEL, J. M.; TINGEY, S. V. Generating and using DNA markers in plants. In: BIRREN, B.; LAI, E. (Ed.). **Analysis of non-mammalian genomes: a practical guide**. Boca Raton: Academic Press, 1996. p. 75-134.
- RAJU, A. J. S.; EZRADANAM, V. Pollination ecology and fruiting behaviour in a monoecious species, *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae). **Current Science**, Bangalore, v. 83, p. 1395-1398, 2002.
- RITLAND, K. Estimation of mating systems. In: TANKSLEY, S. D.; ORTON, T. J. **Isozymes in plant genetics and breeding**. Part A. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1983. p. 289-302.
- RITLAND, K.; JAIN, S. A model for the estimation of outcrossing rate and gene frequencies using independent loci. **Heredity**, London, v. 47, p. 35-52, 1981.
- ROBLENDO-ARNUNCIO, J. J.; GIL, L. Patterns of pollen dispersal in a small population of *Pinus sylvestris* L. revealed by total-exclusion paternity analysis. **Heredity**, London, v. 94, p. 13-22, 2005.
- ROSADO, T. B.; LAVIOLA, B. G.; FARIA, D. A.; PAPPAS, M. R.; BHERING, L. L.; QUIRINO, B.; GRATTAPAGLIA, D. Molecular markers reveal limited genetic diversity in a large germplasm collection of the biofuel crop *Jatropha curcas* L. in Brazil. **Crop Science**, Madision, v. 50, p. 2372-2382, 2010.
- SANDERSON, K. Wonder weed plans fail to flourish. **Nature**, London, v. 461, n. 17, p. 328-329, 2009.
- SATURNINO, H. M.; PACHECO, D. D.; KAKIDA, J.; TOMINAGA, N.; GONÇALVES, N. P. Cultura do pinhão manso (*Jatropha curcas* L.). **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 26, n. 229, p. 44-74, 2005.
- SEBBENN, A. M.; KAGEYAMA, P. Y.; SIQUEIRA, A. C. M. F.; ZANATTO, A. C. E. Taxa de cruzamento em populações de *Cariniana legalis* (Mart.) o. Ktze.: implicações para a conservação e o melhoramento genético. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v. 58, p. 25-40, 2000.
- SEBBENN, A. M.; KAGEYAMA, P. Y.; VENCOVSKY, R. Variabilidade genética, sistema reprodutivo e estrutura genética espacial em *Genipa americana* L. através de marcadores isoenzimáticos. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v. 53, p. 15-30, 1998.
- SEOANE, C. E. C.; KAGEYAMA, P. Y.; SEBBENN, A. M. Efeitos da fragmentação florestal na estrutura genética de populações de *Esenbeckia leiocarpa* Engl. (Guarantã). **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v. 57, p. 123-139, 2000.
- SEOANE, C. E. C.; SEBBENN, A. M.; KAGEYAMA, P. Y. Sistema reprodutivo em populações de *Esenbeckia leiocarpa*. **Revista do Instituto Florestal**, São Paulo, v. 13, p. 21-28, 2001.

SHU-PING, N.; LIN-BING, X.; LU, Y.; BING-ZHI, H.; XUE-JUN, G. Genome composition and genetic diversity of *Musa* germplasm from China revealed by PCR-RFLP and SSR markers. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 114, n. 4, p. 281-288, 2007.

SILVA, C. R. S.; ALBUQUERQUE, P. S. B.; ERVEDOSA, F. R.; MOTA, J. W. S.; FIGUEIRA, A.; SEBBENN, A. M. Understanding the genetic diversity, spatial genetic structure and mating system at the hierarchical levels of fruits and individuals of a continuous *Theobroma cacao* population from the Brazilian. **Heredity**, London, v. 106, p. 973-985, 2011.

SILVA, R. M.; BANDEL, G.; MARTINS, P. S. Mating system in an experimental garden composed of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) ethnovarieties. **Euphytica**, Wageningen, v. 134, p. 127-135, 2003.

SIMKO, I.; HU, J. Population structure in cultivated lettuce and its impact on association mapping. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Geneva, v. 133, p. 61-68, 2008.

SNUSTAD, D. P.; SIMMONS, M. J. **Fundamentos de genética**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 755 p.

SUDHEER PAMIDIMARRI, D. V. N.; CHATTOPADHYAY, B.; REDDY, M. P. Genetic divergence and phylogenetic analysis of genus *Jatropha* based on nuclear ribosomal DNA ITS sequence. **Molecular Biology Reports**, Dordrecht, v. 36, p. 1929-1935. 2009a.

SUDHEER PAMIDIMARRI, 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, p. 1357-1364, 2009b.

SUGANUMA, E.; CIAMPI, A. Y. Análise genética populacional de Jatobá (*Hymenaea* spp Legumiminosaea) utilizando microssatélites. In: ENCONTRO LATINO-AMERICANO DE BIOTECNOLOGIA VEGETAL: REDBIO, 4., 2001, Goiânia. **Resumos...** Montevideo, Argentina: REDBIO, 2001. p. 148. Disponível em: <[http://www.redbio.org/portal/encuentros/enc\\_2001/posters;03-007.pdf](http://www.redbio.org/portal/encuentros/enc_2001/posters;03-007.pdf)>. Acesso em: 27 out. 2009.

SUJATHA, M.; DHINGRA, M. Rapid plant regeneration from various explants of *Jatropha integerrima*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 35, n. 3, p. 293-296, 1993.

SUNITA, K.; KOCHHAR, V. K.; SINGH, S. P.; KATIYAR, R. S.; PUSHPANGADAN, P. Differential rooting and sprouting behavior of two *Jatropha* species and associated physiological and biochemical changes. **Current Science**, Bangalore, v. 89, n. 6, p. 936-938, 2005.

VENCOVSKY, R.; NASS, L. L.; CORDEIRO, C. M. T.; FERREIRA, M. A. J. F. Amostragem em recursos genéticos vegetais. In: NASS, L. L. (Ed.) **Recursos genéticos vegetais**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007. p. 233-280.

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

WU, K. S.; TANKSLEY, D. Abundance polymorphism and genetic mapping of microsatellites in rice. **Molecular and General Genetics**, Berlin, v. 241, n. 1-2, p. 225-235, 1993.

WWF. **Global market study on *Jatropha***. London: GEXSI LLP, 2008. 60 p.

YAOWALAK, N.; ARUNEE, W.; THITAPORN, P.; BONGLUCK, K.; RUNGSARID, K.; TANEE, R.; CHALERMPOLO, P. Genetic diversity of physic nut (*Jatropha curcas* L.) revealed by SSR markers. **Journal of Crop Science and Biotechnology**, Heidelberg, v. 14, p. 105-110, 2011.

YE, M.; CAIYAN, L.; FRANCIS, G.; MAKKAR, H. P. S. Current situation and prospects of *Jatropha curcas* as a multipurpose tree in China. **Agroforestry Systems**, Dordrecht, v. 76, p. 487- 497, 2009.

ZANE, L.; BARGELLONI, L.; PATARNELLO, T. Strategy for microsatellite isolation: a review. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 11, p. 1-16, 2002.

ZUCCHI, M. I. Análise da estrutura genética de *Eugenia dysenterica* DC utilizando marcadores RAPD e SSR. 2002. 130 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

ZUCCHI, M. I.; BRONDANI, R. P. V.; PINHEIRO, J. B.; CHAVES, L. J.; COELHO, A. S. G.; VENCOVSKY, R. Genetic structure and gene flow in *Eugenia dysenterica* DC in the Brazilian Cerrado utilizing SSR markers. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 26, n. 4, p. 449-457, 2003.

### 3. PRESERVAÇÃO DE TECIDOS FOLIARES DE PINHÃO MANSO PARA EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO

#### Resumo

A qualidade do DNA genômico extraído de tecidos vegetais é um fator determinante para o bom desenvolvimento das técnicas moleculares. O pinhão manso é uma planta que possui em seus tecidos, látex, compostos polifenólicos e polissacarídeos que podem interferir nos procedimentos de isolamento de DNA, e conseqüentemente nas reações de restrição, amplificação e clonagem. Vários métodos de extração de DNA genômico foram desenvolvidos para o pinhão manso, contudo os procedimentos de coleta e preservação dos tecidos vegetais são muitas vezes ineficientes para a extração do ácido nucléico de qualidade. O objetivo desse trabalho foi desenvolver um método simples e de baixo custo para amostragem dos tecidos, visando extração de DNA genômico com qualidade para estudos moleculares. O método utiliza o etanol como solução de fixação e preservação do material genético em folhas recém expandidas de pinhão manso. A qualidade do DNA genômico foi avaliada por eletroforese em gel de agarose e a clivagem pela endonuclease *EcoRI*. Com relação ao rendimento da extração, a concentração de DNA foi determinada por fluorimetria e espectrofotometria. As amostras de tecidos foliares foram processadas através das técnicas de microscopia de luz e eletrônica de transmissão, visando verificar a integridade do DNA genômico após exposição ao etanol. O etanol se mostrou extremamente eficiente na conservação de amostras por um período de até 30 dias, permitindo a extração de DNA genômico de qualidade. Esta tecnologia se mostra potencialmente promissora para a coleta e conservação de materiais biológicos obtidos em regiões distantes daquela onde serão realizadas as análises, como também para auxiliar instituições de ensino com recursos limitados por todo o país.

**Palavras-chave:** Coleta e conservação de tecidos. Etanol. DNA genômico. Microscopia.

## Abstract

The quality of genomic DNA extracted from plant tissues is a determining factor for the successful development of molecular techniques. Physic nut is a plant that has in its tissues, polysaccharides and polyphenolic metabolites that can interfere with DNA isolation procedures, and consequently the restriction reactions, amplification and cloning. Various methods of extraction of genomic DNA were developed for *Jatropha*, however the procedures for collection and preservation of plant tissues are often inefficient for the extraction of nucleic acid quality. The aim of this study was to develop a simple and inexpensive method to sample tissue, in order to extract genomic DNA of good quality for molecular studies. The method uses ethanol as a solution for fixation and preservation of genetic material in newly expanded leaves of *Jatropha*. The quality of genomic DNA was assessed by agarose gel electrophoresis and cleavage by the endonuclease *EcoRI*. Regarding the yield of extraction, DNA concentration was determined by fluorimetry and spectrophotometry. Leaf tissue samples were processed through the techniques of light microscopy and transmission electron microscopy, in order to verify the integrity of genomic DNA after exposure to ethanol. Ethanol has proven extremely effective in the conservation of samples for a period of 30 days, allowing the extraction of good quality genomic DNA. This technology has shown promising potential for the collection and preservation of biological materials obtained in regions distant from that where the analysis will be performed, but also to assist educational institutions with limited resources across the country.

**Keywords:** Collection and preservation of tissues. Ethanol. Genomic DNA. Microscopy.

### 3.1 Introdução

Técnicas moleculares são utilizadas para determinação da diversidade genética existente em populações naturais ou mesmo em coleções de germoplasma (SLOTTA et al., 2006; REUSCH, 2006). Estes estudos exigem o isolamento do DNA genômico de um grande número de amostras, exigindo muitas vezes a coleta de tecidos em locais distantes, o que impede o processamento imediato das amostras (BHATTACHARJEE et al., 2009). Desta forma, o desenvolvimento de técnicas adequadas para a coleta e preservação de amostras é essencial para o bom desenvolvimento das técnicas moleculares.

Muitas técnicas de preservação de tecidos têm sido descritas nos últimos anos, tais como a secagem das amostras à temperatura ambiente ou em estufas, criopreservação com gelo seco ou nitrogênio líquido, liofilização, soluções tampões ou com sílica gel (KILPATRICK, 2002; WEHAUSEN et al., 2004; REUSCH, 2006), porém, muitos desses produtos não estão disponíveis nos locais de coleta. A alteração na qualidade do DNA genômico, quando utilizadas técnicas inadequadas de preservação das amostras, que acabam sofrendo a ação de polifenóis.

A presença de compostos secundários em tecidos vegetais, tais como polissacarídeos, látex, resinas, ou excesso de compostos fenólicos dificulta a obtenção de DNA com a pureza necessária para procedimentos como a clivagem, amplificação e clonagem (DHAKSHANAMOORTHY; SELVARAJ, 2009). Dentre as espécies tropicais, as Euphorbiaceas se destacam pela presença de polifenóis, grande quantidade de polissacarídeos e látex, que afetam a qualidade e quantidade do DNA genômico extraído de tecidos foliares. O pinhão manso é nativo da América tropical, amplamente disseminado pelo mundo devido à característica de produzir óleo e metabólitos secundários com propriedades de interesse para as indústrias de biocombustíveis e farmacêutica (SATURNINO et al., 2005). Contudo, as informações agrônômicas sobre a cultura ainda são escassas, principalmente com relação ao desenvolvimento de cultivares comerciais. A análise de polimorfismo de DNA está sendo utilizado para se conhecer a diversidade genética existente, visando à conservação da espécie, como o planejamento adequado de programas de melhoramento genético, visando obter materiais produtivos.

Várias metodologias para a extração do DNA genômico do pinhão manso já foram utilizadas por Basha e Sujatha (2007), Ganesh et al. (2008), Ranade et al. (2008), Kumar et al. (2009), Sudheer Pamidimarri et al. (2009) e Dhakshanamoorthy e Selvaraj (2009), visando eliminar os compostos fenólicos e os polissacarídeos, capazes de prejudicar a qualidade dos ácidos nucleicos e reduzir o rendimento e a pureza da molécula. De forma geral, as metodologias de extração de DNA genômico para pinhão manso baseiam-se nos trabalhos de Dellaporta et al. (1983) e Doyle e Doyle (1990), com pequenas adaptações.

Basha e Sujatha (2007) e Sudheer Pamidimarri et al. (2009) trataram os tecidos foliares de pinhão manso com nitrogênio líquido e para a extração do DNA utilizaram o método proposto por Doyle e Doyle (1990) com pequenas modificações. Ganesh et al. (2008) e Kumar et al. (2009) utilizaram folhas frescas também tratadas com nitrogênio líquido e para a extração do DNA o método proposto por Dellaporta et al. (1983). Ranade et al. (2008) utilizaram nitrogênio líquido e para a extração do DNA o kit DNeasy 96 Plant (Qiagen, USA). Diferentemente, Dhakshanamoorthy e Selvaraj (2009) propuseram uma metodologia simples que visava isolar DNA utilizando o tratamento dos tecidos foliares de pinhão manso com 96% etanol por um período de 1 h na fixação das folhas, ao invés de imergir a amostra em nitrogênio líquido.

O objetivo do trabalho foi avaliar a utilização de solução de etanol para fixação, transporte e armazenamento de folhas de pinhão manso, por um período de até 30 dias e verificar a qualidade e o rendimento do ácido nucleico após o processo de extração.

## **3.2 Material e Métodos**

### **3.2.1 Materiais vegetais**

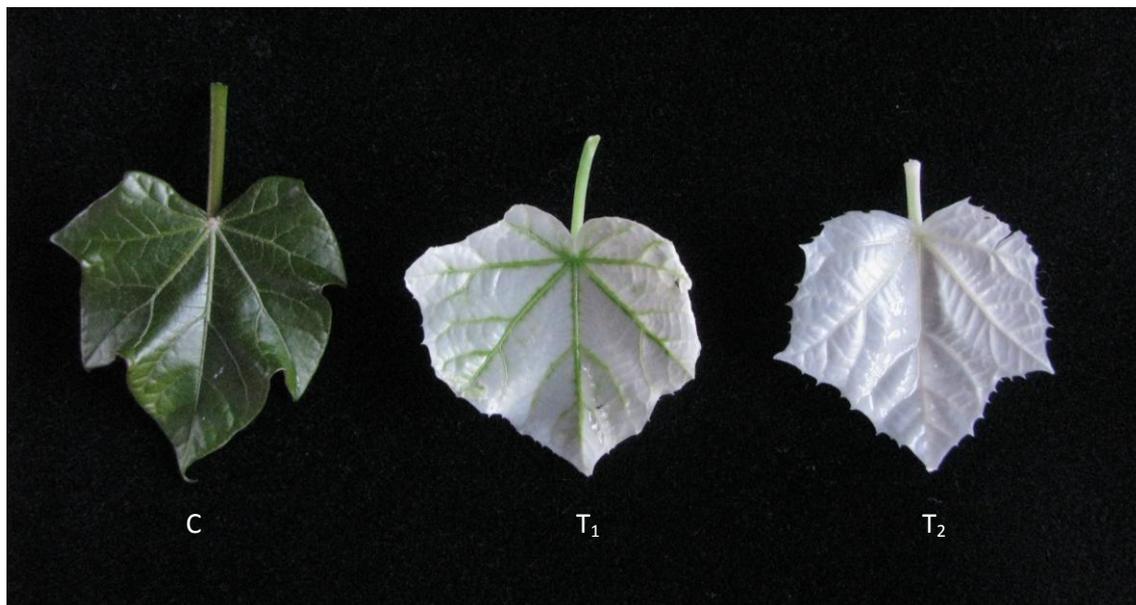
Três acessos de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.), 'JC43', 'JC76' e 'JC203', foram escolhidos aleatoriamente no banco de germoplasma do Laboratório de Fisiologia Vegetal e Cultura de Tecidos da Universidade Federal de São Carlos, Araras – SP e tiveram suas folhas recém expandidas coletadas. Os três acessos são originários do Brasil, sendo 'JC43' de Montes Claros de Goiás - GO (população 12), 'JC76' de Uberlândia – MG (população 14), e 'JC203' de Irecê - BA (população 23) (Anexo A). Uma parte dos tecidos foi armazenada em tubos tipo *Falcon* de 15 mL com etanol 96%

(8 mL) e a outra parte em tubos tipo *Falcon* de 15 mL com nitrogênio líquido. Três repetições de cada tratamento foram processadas no mesmo dia, logo após a coleta, enquanto que o restante foi processado 30 dias após. O material mantido em etanol ficou em temperatura ambiente, enquanto que as amostras com nitrogênio líquido foram armazenadas em biofreezer a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### **3.2.2 Microscopia de Luz (ML) e Eletrônica de Transmissão (MET)**

Foram coletadas amostras foliares armazenadas em 96% etanol bem como amostras controles referentes a tecidos foliares frescos recém coletados (Figura 3.1). As amostras foram fixadas em solução de Karnovsky (1965) modificado (2% glutaraldeído, 2% paraformaldeído, 5mM de  $\text{CaCl}_2$  em tampão 0,05M cacodilato de sódio [pH 7,2] por 48 h). Posteriormente, as amostras foram lavadas em tampão 0,1M cacodilato de sódio e fixadas por 1 h em temperatura ambiente com 1% tetróxido de ósmio sob o mesmo tampão. A desidratatação foi realizada em série crescente de acetona em água (30% - 100%), sendo então infiltradas e incluídas em resina Spurr por 48 h. Os cortes semifinos (120 - 200 nm) foram coletados em lâminas de vidro, corados com 2% azul de toluidina em água por 5 min, lavadas em água destilada e secas ao ar. Os cortes foram montados permanentemente em resina Entellan, observados e documentados através de um microscópio de luz na posição vertical (Axioscop 2, Zeiss, Jena, Alemanha). Secções ultra-finas (60 - 90 nm) foram coletadas em grades de cobre (300 *mesh*) e coradas com 2,5% acetato de uranila seguido de citrato de chumbo segundo Reynolds (1963).

Os cortes foram observados em 50 kV utilizando microscópio eletrônico de transmissão (Zeiss, EM 900, Alemanha Ocidental) sendo as imagens digitalizadas.



**Figura 3.1** - Folhas recém expandidas de pinhão manso utilizadas para a extração de ácidos nucleicos: C – controle – folha fresca; T1 – folha mantida em 96% etanol absoluto por 1 hora; T2 – folha mantida em 96% etanol absoluto por 30 dias a temperatura ambiente

### 3.2.3 Extração de DNA

A extração do DNA foi realizada como descrito por Sereno et al. (2006), com pequenas modificações. Tecidos foliares (50 mg) foram homogeneizados e transferidos para microtubos de 1,5 mL contendo 650  $\mu$ L de tampão de extração, composto de 2% Brometo de Cetil Trimetil Amônio (CTAB); 1,4 M NaCl; 100 mM Tris-HCl (pH 8,0); 20 mM de Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético (EDTA); 1% Polivinilpolipirrolidona (PVPP); 0,2% de  $\beta$ -mercaptoetanol; 0,1  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  Proteinase K. Os tubos com as amostras foram homogeneizados por inversão e incubados a 55° C por 60 min. Logo após, foram adicionados 600  $\mu$ L de solução clorofórmio – álcool isoamílico (24:1, v/v). As misturas foram centrifugadas a 12.000 g por 5 min. Após a centrifugação foram adicionados aos sobrenadantes 600  $\mu$ L de clorofórmio – álcool isoamílico (24:1, v/v) e 200  $\mu$ L de tampão de extração sem  $\beta$ -mercaptoetanol e Proteinase K. As misturas foram novamente centrifugadas a 12.000 g por 5 min. Os extratos passaram por mais uma extração orgânica, seguindo os passos da etapa anterior. As fases aquosas foram

transferidas para novos microtubos, 600  $\mu\text{L}$  de isopropanol absoluto gelado foi adicionado em cada amostra e as soluções foram incubadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 1 h. Posteriormente, procedeu-se a centrifugação a 12.000  $g$  por 5 min, descartando a fase líquida das amostras. Os *pellets* com DNA foram lavados com 1 mL de álcool 70% e ressuspendidos em 30  $\mu\text{L}$  de TE (10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 1 mM de EDTA, pH 8,0), contendo  $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  RNase.

### 3.2.4 Qualidade e restrição de DNA genômico

A qualidade do DNA genômico foi avaliada por eletroforese em gel 0,8% agarose revelado com *SYBRgold* (Invitrogen, Molecular Probes, Eugene, Oregon, EUA). Posteriormente, foi realizada a digestão de 1  $\mu\text{g}$  do DNA genômico com 10 U da endonuclease de restrição *EcoRI*.

### 3.2.5 Quantificação do DNA genômico

A concentração do DNA total extraído foi determinada por fluorimetria (DyNA Quant 2000 Fluorometer, Amersham Biociences, Buckinghamshire, Reino Unido). A amostra de DNA também foi quantificada em espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Wilmington, USA).

### 3.2.6 Amplificação e análise das regiões ITS

Para a amplificação das regiões de ITS foram utilizados os iniciadores: ITS1-18S: CGTAACAAGGTTTCCGTAGG e ITS4: TCCTCCGCTTATTGATATGC de acordo com White et al. (1990). As reações de amplificação foram realizadas em um volume de 20  $\mu\text{L}$ , contendo 25 ng de DNA; 10X Tampão da *Taq* com KCl [100 mM Tris-HCl (pH 8,8); 500 mM KCl; 0,8% Nonidet P40]; 100  $\mu\text{M}$  de cada dNTP, 1,5 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 0,2  $\mu\text{M}$  de cada iniciador (ITS1 e ITS4) e 1 U de *Taq polymerase* (Fermentas Life Science). As amplificações foram conduzidas com desnaturação inicial a  $94^{\circ}\text{C}$  por 3 min, seguido de 35 ciclos de 30 s a  $94^{\circ}\text{C}$ , 1 min a  $58^{\circ}\text{C}$ , 1 min a  $72^{\circ}\text{C}$  e finalmente uma etapa de extensão final a  $72^{\circ}\text{C}$  por 7 min.

Os produtos de PCR da amplificação das regiões de ITS foram separados por meio de eletroforese em gel 1,5 % agarose em tampão Tris-Borato-EDTA (10X TBE: 0,89 M de Trisma-base; 0,86 M de Ácido Bórico, 0,02 M de EDTA [pH 8,0]) a 5 V.cm<sup>-1</sup>, revelados com *SYBRgold*.

### 3.2.7 Amplificação e análise de microssatélites

As reações de microssatélites foram conduzidas empregando-se pares de iniciadores para os locos *mJCENA41*, *mJCENA87* e *JC613* (descrito com maiores detalhes nos capítulos 5 e 6). Para a realização da PCR foram utilizados 25 ng de DNA para cada reação de 20 µL, contendo 10X Tampão da *Taq* com KCl [500 mM KCl; 100 mM Tris-HCl (pH 8,8); 0,8% Nonidet P40]; 100 µM de cada dNTP (dATP, dTTP, dGTP e dCTP); 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,2 µM de cada iniciador e 1U de *Taq polymerase* (Fermentas Life Science). As amplificações foram realizadas em termociclador, empregando um programa *touchdown*, com desnaturação inicial a 94°C por 3 min, seguido de 10 ciclos, sendo que em cada ciclo 40 s a 94°C, 40 s a 60°C, 1 min a 72°C, reduzindo um grau a cada ciclo, seguido de 35 ciclos de 40 s a 94°C, 40 s a 50°C, 1 min a 72°C. Os fragmentos foram amplificados e analisados em gel de 7% poliacrilamida, revelado com nitrato de prata (CRESTE et al., 2001).

## 3.3 Resultados e Discussão

Em todo procedimento de extração de DNA, um dos fatores cruciais é a forma de coleta e preservação dos tecidos amostrados. Mesmo que o ácido nucléico possa ser isolado com sucesso, a quantidade e a qualidade podem ser afetadas significativamente pela condição do tecido antes da extração, devido à ação deletéria dos metabólitos secundários (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1996).

Para evitar a degradação dos ácidos nucléicos é recomendada a utilização de tecidos frescos (ALJANABI; MARTINEZ, 1997), porém muitas vezes esse procedimento é inviabilizado, necessitando de armazenamento prévio para posteriormente serem analisados. Assim sendo, algumas estratégias pode ser utilizada, como a criopreservação durante o transporte e no acondicionamento dos tecidos vegetais até o momento da extração (JOFUKU; GOLDBERG, 1988); porém, esta estratégia pode ser inviabilizada devido a dificuldades de acesso e/ou disponibilidade de

refrigeração. O alto custo do nitrogênio líquido e do gelo seco e a durabilidade é outro fator negativo que deve ser considerado.

O grau de pureza do DNA extraído de plantas pode ser afetado pela presença de polissacarídeos nos tecidos (FIGUEIRA, 2011). Kumar et al. (2003) relataram que a presença de elevados níveis de polissacarídeos podem interferir no processo de isolamento de ácidos nucleicos, além de inibir uma vasta gama de enzimas como as endonucleases, ligases e polimerases. A maioria dos métodos de extração não são efetivos na separação do DNA dos polissacarídeos, isto deve provavelmente a similaridade estrutural entre esses dois tipos de polímeros (FIGUEIRA, 2011). Outro fator importante a ser considerado é a contaminação por compostos fenólicos, que levam a oxidação do DNA e que pode ser evitada agregando polivinilpirrolidona solúvel (PVP),  $\beta$ -mercaptoetanol ao tampão de extração (HAQUE et al., 2008; FIGUEIRA, 2011). Dhakshanamoorthy e Selvaraj (2009) verificaram que o etanol possui a capacidade de inibir a ação de metabólitos secundários, tais como os fenóis, além de inativar enzimas que poderiam degradar o DNA genômico.

A maior parte dos protocolos de extração de ácidos nucleicos disponíveis deriva basicamente do método descrito por Dellaporta et al. (1983) e por Doyle e Doyle (1990), quando se usa o detergente brometo de hexadeciltetrametilamônio (CTAB), e o DNA é solubilizado sob altas concentrações de sal (FIGUEIRA, 2011). O detergente CTAB é o mais indicado para a extração de DNA de plantas que contêm muitos polissacarídeos (STEWART JR; VIA, 1993).

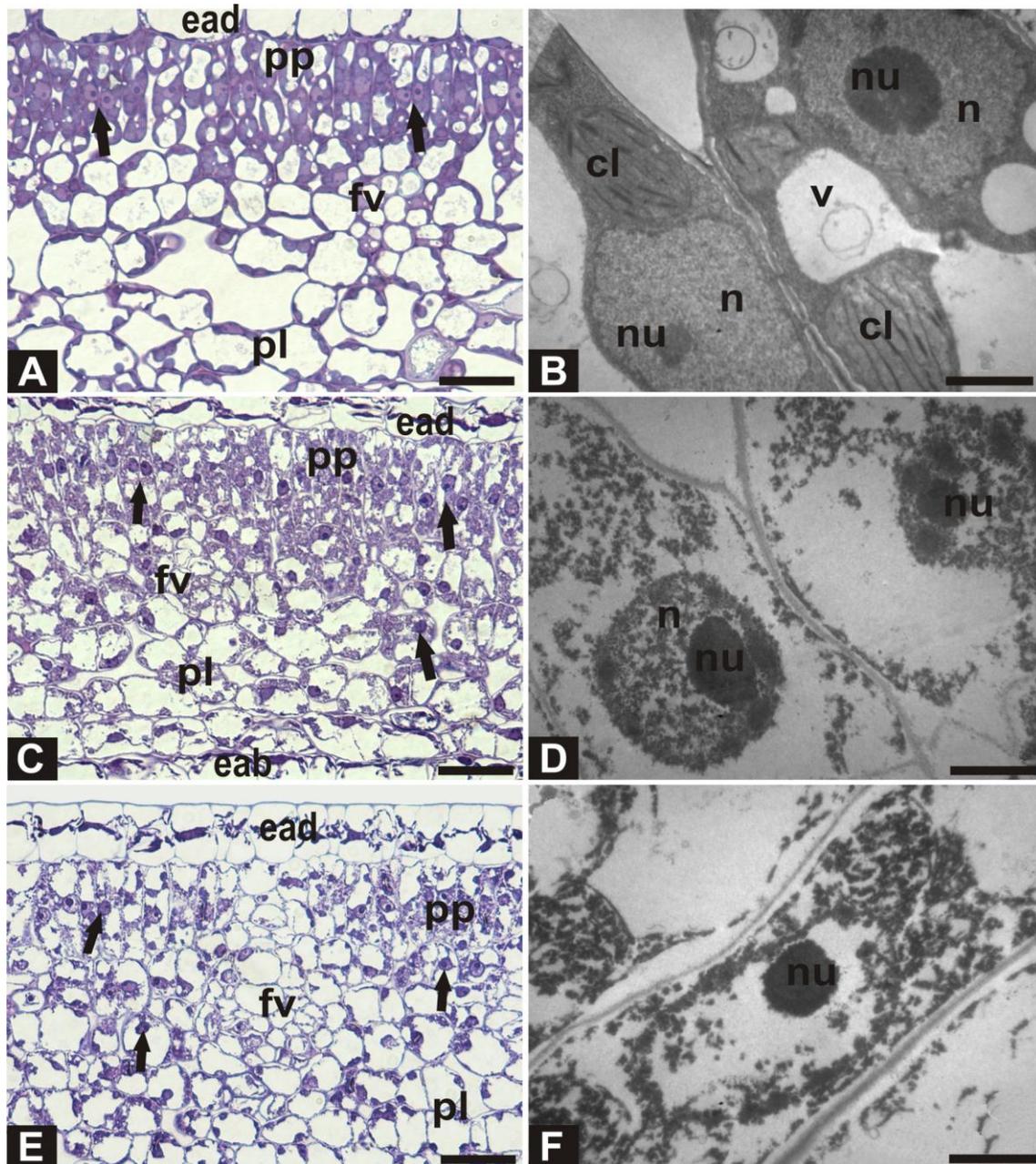
De modo geral, as metodologias de extração de DNA consistem na ruptura dos tecidos através de procedimentos físicos tal como a maceração com nitrogênio líquido; liberação dos compostos celulares por meio de lise das células com detergentes como o CTAB e agentes quelantes como o Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético (EDTA), composto orgânico que forma complexos estáveis com os diversos íons metálicos, tais como magnésio, cálcio, manganês, ferro, zinco, cobalto, cobre, chumbo e níquel. Além disso, são utilizados polivinilpirrolidona (PVP) ou polivinilpolipirrolidona (PVPP), inibidores de compostos fenólicos, clorofórmio e  $\beta$ -mercaptoetanol, para a inativação das nucleases, remoção de restos de tecidos celulares e precipitação de proteínas indesejáveis (FIGUEIRA, 2011). Nesta etapa podem ser utilizadas proteases como a proteinase K para facilitar a separação dos ácidos nucleicos das proteínas das cromatinas e, finalmente, a recuperação dos ácidos nucleicos totais por precipitação em

isopropanol e eliminação de RNAs com ajuda de RNAses (GAWAL; JARRET, 1991; FANG et al., 1992; ALJANABI et al., 1999; MICHIELS et al., 2003).

O pinhão manso é uma planta tropical que possui grande quantidade de polissacarídeos, látex e compostos fenólicos em seus tecidos (DHAKSHANAMOORTHY; SELVARAJ, 2009). Sendo assim, o processo de isolamento do DNA deve eliminar todos os compostos secundários, RNAs e constituintes celulares indesejáveis, mantendo a qualidade das moléculas que devem permanecer inalteradas durante o processo de extração, pois as informações contidas no DNA dependem da integridade da sequência de nucleotídeos da molécula.

Neste trabalho a exposição dos tecidos foliares de pinhão manso ao etanol promoveu a destruição do conteúdo celular solúvel, preservando a qualidade e integridade do DNA genômico (Figuras 3.1 e 3.2).

As secções transversais da lâmina foliar do pinhão manso utilizado como controle através da microscopia de luz (ML) revelaram que a epiderme é uniestratificada, com células de tamanhos irregulares; o mesófilo é heterogêneo, com estrutura dorsiventral; o parênquima paliçádico é bi-estratificado, compacto deixando somente os espaços formados pelas câmaras subestomáticas, sendo as células do estrato superior mais longa que as do estrato inferior. O parênquima lacunoso é constituído por cerca de oito camadas de células, irregulares, resultando em espaços com várias dimensões. Observa-se também ao longo da nervura mediana, um feixe vascular formado por uma série de células de xilema e outra série de células de floema (Figura 3.2 A). Já nos tecidos foliares mantidos em etanol absoluto por 1 h, verificou-se a desorganização do conteúdo da epiderme adaxial, parênquima paliçádico, dos feixes vasculares, parênquima lacunoso e da epiderme abaxial (Figura 3.2 C), sendo que esta desorganização foi mais acentuada após o período de 30 dias em etanol (Figura 3.2 E). Através da microscopia eletrônica de transmissão (MET) tornou-se possível constatar a integridade do conteúdo celular nos tecidos controle, permitindo a visualização de cloroplastos, vacúolos do núcleo e nucléolo das células (Figura 3.2 B), enquanto que após 1 hora em etanol, houve destruição de grande parte do conteúdo celular com a desestruturação das organelas adjacentes ao núcleo (Figura 3.2 D). Após 30 dias em etanol, os tecidos foliares apresentaram precipitação e concentração do DNA genômico e destruição de quase todo o conteúdo celular (Figura 3.2 F).



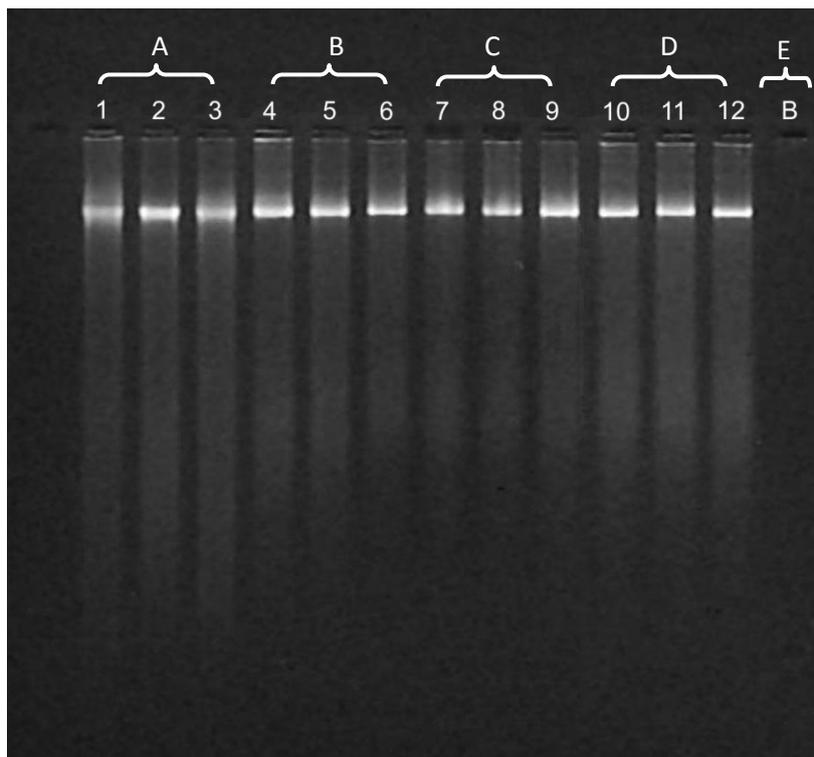
**Figura 3.2** - Secção transversal da lâmina foliar de pinhão manso observada em microscopia de luz (ML) e eletrônica de transmissão (MET). A) Controle (ML); B) Controle (MET); C) 1 h após tratamento (ML); D) 1 h após tratamento (MET); E) 30 dias após tratamento (ML); F) 30 dias após tratamento (MET); epiderme adaxial (ead); parênquima paliçádico (pp); feixes vasculares (fv); parênquima lacunoso (pl); epiderme abaxial (eab); núcleo (n); nucléolo (nu); cloroplasto (cl); vacúolo (v); Setas: DNA genômico; Barra: ML – 50  $\mu$ m; MET - 2  $\mu$ m

Nossos dados discordam com Pyle e Adams (1989), que relataram que o etanol ou outros solventes orgânicos podem provocar rápida deterioração dos ácidos nucléicos nos vegetais. Diferentemente, Murray e Pitas (1996) demonstram que o etanol pode ser

utilizado com grande sucesso na preservação do DNA e RNA dos tecidos foliares de milho. Similarmente, Linke et al. (2010), utilizando o etanol para a conservação das amostras e extração dos ácidos nucleicos de leveduras, *Arabidopsis thaliana* e cenoura (*Daucus carota*), concluíram que a desidratação dos tecidos, permite a extração de DNA e RNA com alto rendimento e integridade, além de facilitar a estocagem das amostras.

A maior exposição dos tecidos ao etanol e a utilização da baixa temperatura são capazes de minimizar os efeitos negativos dos metabólitos, permitindo a extração do DNA genômico com alta qualidade e com relação de OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> superior a 1,80 (Tabela 3.1), considerada crítica como indicadora de qualidade (SAMBROOK et al., 1989; HENRY, 1997).

O rendimento de DNA genômico obtido a partir de tecidos foliares de pinhão manso variou de 4,3 a 13,6 µg/g de tecido (Tabela 3.1). As maiores concentrações de DNA foram obtidas nas amostras preservadas em etanol absoluto por 1 h. Para as amostras preservadas nos outros tratamentos, a quantidade de DNA extraída foi menor, porém com alta qualidade (Figura 3.3 B, C e D).



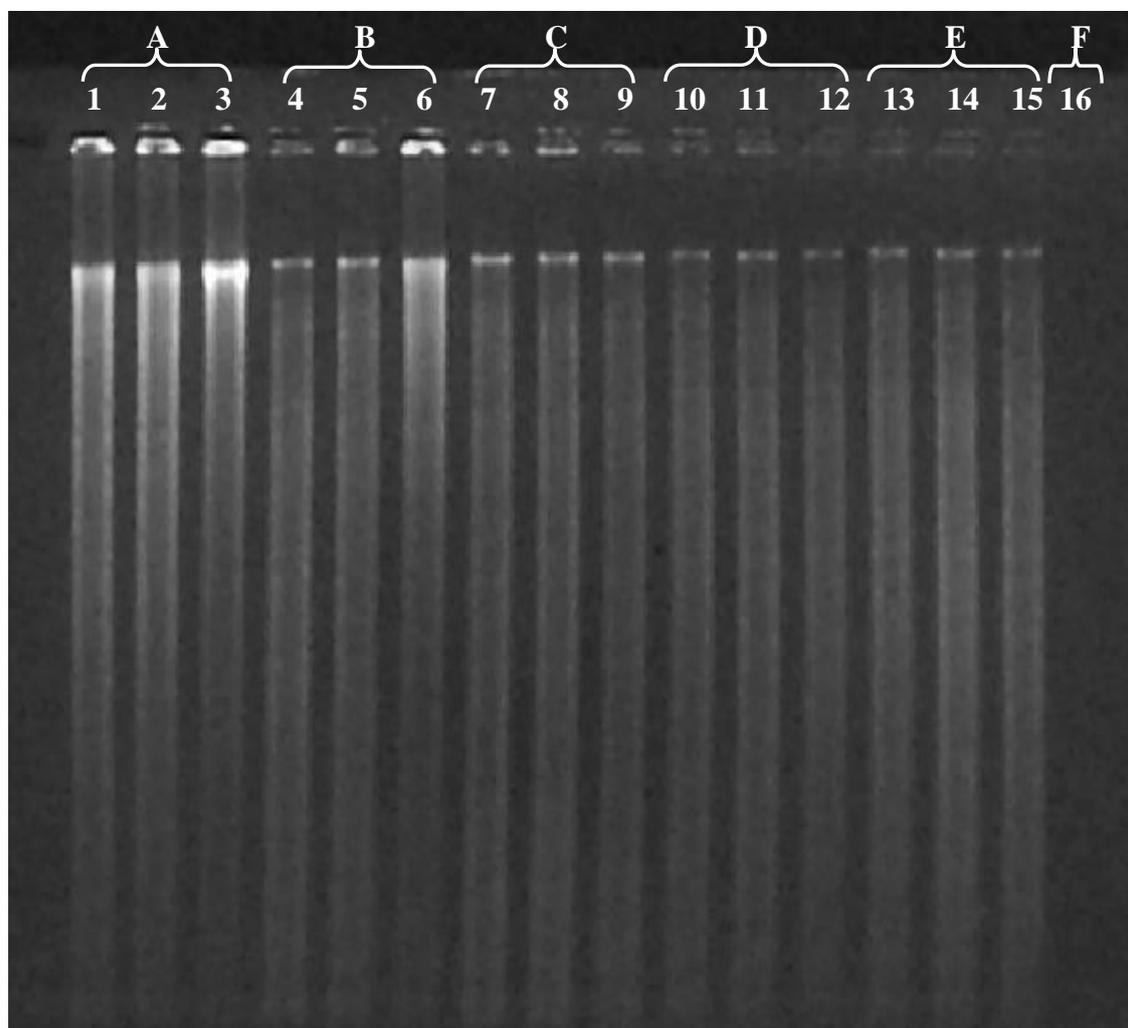
**Figura 3.3** - Visualização da qualidade do DNA genômico obtido de folhas de pinhão manso em eletroforese de gel 0,8% agarose. A) DNA obtido de tecidos foliares tratados com etanol absoluto por 1 h; B) DNA obtido de tecidos foliares armazenados e processados em nitrogênio líquido; C) DNA obtido de tecidos foliares tratados com etanol absoluto por 30 dias; D) DNA obtido de tecidos foliares armazenados a  $-80^{\circ}\text{C}$  por 30 dias e maceradas com nitrogênio líquido; E) B - branco

O DNA genômico obtido a partir dos acessos de pinhão manso foi digerido com a endonuclease *EcoRI*, produzindo um bom padrão de fragmentos, indicando a digestão completa das amostras para ambos os métodos de preservação dos tecidos vegetais (Figura 3.4). Sharma et al. (2003), testando diversas metodologias para a extração de DNA genômico, dentre as quais a utilização do etanol absoluto, conseguiram a digestão completa do ácido nucléico de variedades de *Brassica*.

Observando os resultados obtidos nos géis tanto para qualidade genômico quanto para a digestão do DNA foi verificado que a preservação dos tecidos em etanol se mostra similar às preservadas e processadas em nitrogênio líquido.

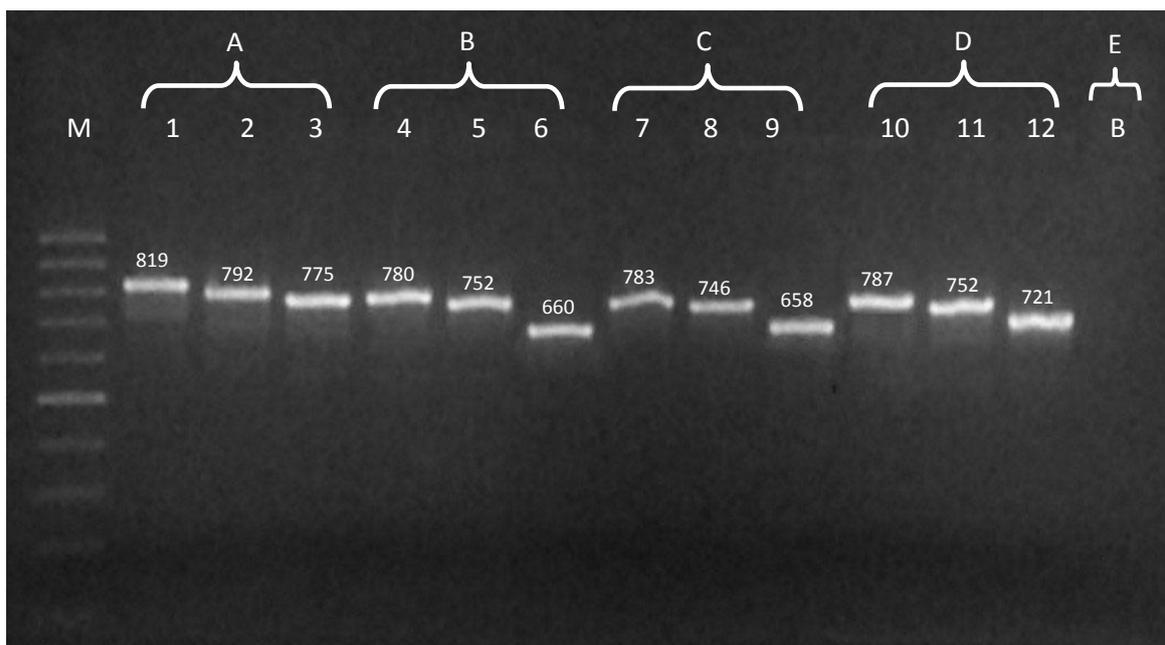
**Tabela 3.1** - Valores médios da quantificação e relação de pureza do DNA genômico isolado a partir de folhas recém expandidas de pinhão manso. A) folhas tratadas com etanol absoluto por 1 h; B) folhas armazenadas por 1 h e processadas em nitrogênio líquido; C) folhas tratadas com etanol absoluto por 30 dias; D) folhas armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  por 30 dias e maceradas com nitrogênio líquido

Amostras	Quantificação ( $\mu\text{g/g}$ tecido)	Relação 260/280
Etanol absoluto – 1h (A)	13,6	1,74
Nitrogênio líquido – 1 h (B)	4,3	1,93
Etanol – 30 dias (C)	4,5	1,90
Biofreezer – 30 dias (D)	5,0	1,93



**Figura 3.4** - Digestão de  $1\mu\text{g}$  de DNA genômico obtido de folhas de pinhão manso. A) tecidos foliares frescos; B) tecidos foliares tratados com etanol absoluto por 1 h; C) tecidos foliares armazenados e processados em nitrogênio líquido; D) tecidos foliares tratados com etanol absoluto por 30 dias; E) tecidos foliares armazenados a  $-80^{\circ}\text{C}$  por 30 dias e maceradas com nitrogênio líquido; F) B - branco

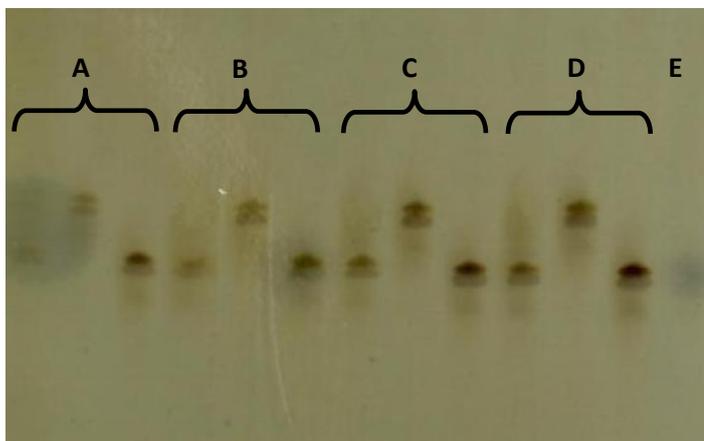
A amplificação das amostras de DNA foi utilizada para verificar a integridade das moléculas. O DNA genômico, isolado dos acessos de pinhão manso submetidos a todos os tratamentos foi utilizado para amplificar as regiões de ITS. Para os acessos de pinhão manso, o produto da amplificação variou entre 658 e 819 pares de base (pb) (Figura 3.5), similares aos identificados para 345 acessos de pinhão manso (dados apresentados com maiores detalhes no Capítulo 4).



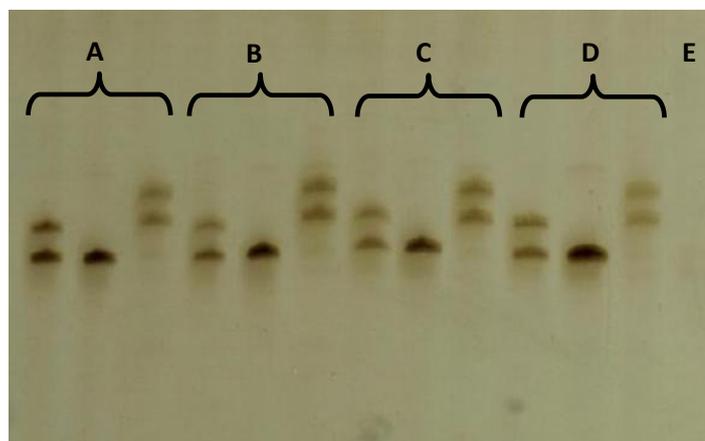
**Figura 3.5** - Amplificação da região ITS. A) tecidos foliares tratados com etanol absoluto por 1 h; B) tecidos foliares armazenados por 1 h e processados em nitrogênio líquido; C) tecidos foliares tratados com etanol absoluto por 30 dias; D) tecidos foliares armazenados a  $-80^{\circ}\text{C}$  por 30 dias e maceradas com nitrogênio líquido; E) B - branco

As amplificações dos locos de microssatélites foram conduzidas empregando-se pares de iniciadores para três locos *mJCENA41* e *mJCENA87* (locos apresentados com maiores detalhes nos Capítulos 5 e 6) e JC613 (SUN et al., 2008).

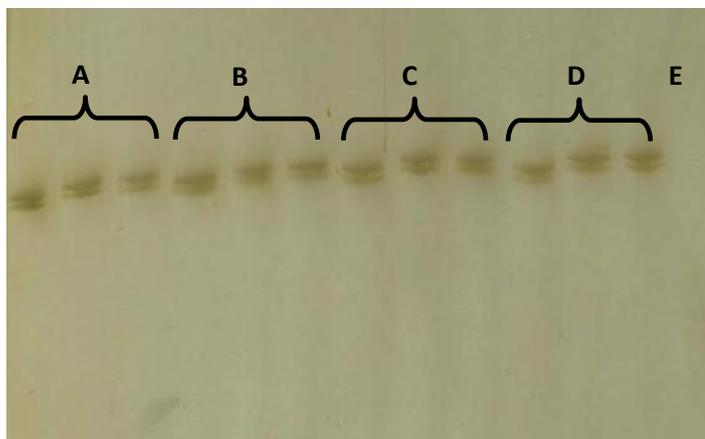
Observa-se que a pureza do DNA extraído aparentemente não interferiu nos padrões de amplificação dos marcadores microssatélites, ou seja, mesmo com a presença de contaminantes em algumas amostras, a amplificação não foi afetada negativamente (Figuras 3.6, 3.7 e 3.8).



**Figura 3.6** - Amplificação do loco *mJCENA41* microssatélites. A) tecidos foliares tratados com etanol absoluto por 1 h; B) tecidos foliares armazenados e processados em nitrogênio líquido; C) tecidos foliares tratados com etanol absoluto por 30 dias; D) tecidos foliares armazenados a  $-80^{\circ}\text{C}$  por 30 dias e maceradas com nitrogênio líquido; E) Branco



**Figura 3.7** - Amplificação do loco *mJCENA87*. A) tecidos foliares tratados com etanol absoluto por 1 h; B) tecidos foliares armazenados e processados em nitrogênio líquido; C) tecidos foliares tratados com etanol absoluto por 30 dias; D) tecidos foliares armazenados a  $-80^{\circ}\text{C}$  por 30 dias e maceradas com nitrogênio líquido; E) Branco



**Figura 3.8** - Amplificação do loco JC613. A) tecidos foliares tratados com etanol absoluto por 1 h; B) tecidos foliares armazenados e processados em nitrogênio líquido; C) tecidos foliares tratados com etanol absoluto por 30 dias; D) tecidos foliares armazenados a  $-80^{\circ}\text{C}$  por 30 dias e maceradas com nitrogênio líquido; E) Branco

### 3.4 Conclusão

A utilização do etanol é uma alternativa viável na preservação do DNA genômico foliar para técnicas moleculares, viabilizando a coleta e envio de amostras entre localidades distantes e/ou instituições com recursos financeiros limitados.

### Referências

ALJANABI, S. M.; MARTINEZ, I. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. **Nucleic Acids Research**, London, v. 25, n. 22, p. 4692–4693, 1997.

ALJANABI S. M.; FORGET, L.; DOOKUN, A. An improved and rapid protocol for the isolation of polysaccharide and polyphenol free sugarcane DNA. **Plant Molecular Biology Reporter**, Heidelberg, v. 17, p. 1-8, 1999.

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

- BHATTACHARJEE, R.; FERGUSON, M.; GEDIL, M.; DUMET, D.; INGELBRECHT, I. Field collection, preservation and large scale DNA extraction procedures for cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 8, n. 15, p. 3424-3430, 2009.
- CRESTE, S.; TULMANN-NETO, A.; FIGUEIRA, A. A detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology Reporter**, Heidelberg, v. 19, p. 299-306, 2001.
- DELLAPORTA, S. L.; WOOD, J.; HICKS, J. B. A plant DNA minipreparation: version II. **Plant Molecular Biology Reporter**, Heidelberg, v. 1, p. 19-21, 1983.
- DHAKSHANAMOORTTY, D.; SELVARAJA, R. Extraction of genomic DNA from *Jatropha* sp. using modified CTAB method. **Romania Journal Biology – Plant Biology**, Bukharest, Romania, v. 54, p. 117-125, 2009.
- DOYLE, J. J. T.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, Rochester, v. 12, p. 13-15, 1990.
- FANG, G.; HAMMER, S.; GRUMET, R. A quick and inexpensive method for removing polysaccharides from genomic DNA. **Bio Techniques**, Natick, v. 13, p. 52-54, 1992.
- FERREIRA, M. E.; GRATAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2. ed. Brasília, DF: EMBRAPA, CENARGEN, 1996. 220 p.
- FIGUEIRA, A. **Extração de DNA de plantas e fungos**. Piracicaba: CENA/USP, 2008. Disponível em: <<http://web.cena.usp.br/apostilas/Figueira/2008/>>. Acesso em: 3 jul. 2011.
- GANESH, R. S.; PARTHIBAN, T. K.; SENTHIL KUMAR, R.; THIRUVENGADAM, V.; PARAMATHMA, M. Genetic diversity among *Jatropha* species as revealed by RAPD markers. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v. 55, p. 803-809, 2008.
- GAWAL, N. L.; JARRET, R. L. A modified CTAB DNA extraction procedure of *Musa* and *Ipomoea*. **Plant Molecular Biology Reporter**, Heidelberg, v. 9, p. 262-266, 1991.
- HAQUE, I.; BANDOPADHHYAY, R.; MUKHOPADHYAY, K. An optimized protocol for fast genomic DNA isolation from high secondary metabolites and gum containing plants. **Asian Journal of Plants Sciences**, Faisalabad, Pakistan, v. 7, n. 3, p. 304-308, 2008.
- HENRY, R. J. **Practical applications of plant molecular biology**, 1. London: Chapman and Hall, 1997. 280 p.
- JOFUKU, K. D.; GOLDBERG, R. B. Analysis of plant gene structure. In: SHAW, C. H. (Ed.). **Plant Molecular Biology**, a practical approach. Oxford: IRL Press, 1988. p. 37-41.

KARNOVSKY, M. J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, New York, v. 27, p. 137-138, 1965.

KILPATRICK, C. W. Noncryogenic preservation of mammalian tissues for DNA extraction: an assessment of storage methods. **Biochemical Genetics**, New York, v. 40, n. 1-2, p. 53-62, 2002.

KUMAR, A.; PUSHPANGADAN, P.; MEHROTRA, S. Extraction of high molecular weight DNA from dry root tissue of *Berberis lyceum* suitable for RAPD. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 21, p. 309-309, 2003.

KUMAR, R. V.; TRIPATHI, Y. K.; SHUKLA, P.; AHLAWAT, S. P.; GUPTA, V. K. Genetic diversity and relationships among germplasm of *Jatropha curcas* L. revealed by RAPDs. **Trees: Structure and Function**, Heidelberg, v. 23, n. 5, p. 1075-1079, 2009.

LINKE, B.; SCHÖDER, K.; ARTER, J.; GASPERAZZO, T.; WOEHLCKE, H.; EHWALD, R. Extraction of nucleic acids from yeast cells and plant tissues using ethanol as medium for sample preservation and cell disruption. **BioTechniques**, Natick, v. 49, p. 655-657, 2010.

MICHIELS, A.; VAN DEN ENDE, W.; TUCKER, M.; VAN RIET, L.; VAN LAERE, A. Extraction of high quality genomic DNA from latex-containing plants. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 315, p. 85-89, 2003.

MURRAY, M. G.; PITAS, J. W. Plant DNA from alcohol-preserved samples. **Plant Molecular Biology Reporter**, Heidelberg, v. 14, p. 261-265, 1996.

PYLE, M. M.; ADAMS, R. P. *In situ* preservation of DNA in plant specimens. **Taxon**, Utrecht, v. 38, p. 576-581, 1989.

RANADE, S. A.; SRIVASTAVA, A. P.; RANA, T. S.; SRIVASTAVA, J.; TULI, R. Easy assessment of diversity in *Jatropha curcas* L. plants using two single-primer amplification reaction (SPAR) methods. **Biomass Bioenergy**, Amsterdam, v. 32, n. 6, p. 533-540, 2008.

REUSCH, T. B. Does disturbance enhance genotypic diversity in clonal organisms? A field test in the marine angiosperm *Zostera marina*. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 15, p. 277-286, 2006.

REYNOLDS, E.S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy, **Journal of Cell Biology**, New York, v. 17, p. 208-212, 1963.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2. ed. Woodbury, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 316 p.

SATURNINO, H. M.; PACHECO, D. D.; KAKIDA, J.; TOMINAGA, N.; GONÇALVES, N. P. Cultura do pinhão manso (*Jatropha curcas* L.). **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 26, n. 229, p. 44-74, 2005.

SERENO, M. L.; VENCOVSKY, R.; ALBUQUERQUE, P. S. B.; FIGUEIRA, A. Genetic diversity and natural population structure of cacao (*Theobroma cacao* L.) from the Brazilian Amazon evaluated by microsatellite markers. **Conservation Genetics**, Heidelberg, v. 7, p. 13-24, 2006.

SHARMA, R.; MAHLA, H. R.; MOHPATRA, T.; BHARGVA, S. C.; SHARMA, M. M. Isolating plant genomic DNA without liquid nitrogen. **Plant Molecular Biology Reporter**, Heidelberg, v. 21, p. 43-50, 2003.

SLOTTA, T. A. B.; ROTHHOUSE, J.; HORVATH, D. P.; FOLEY, M. E. Genetic diversity of *Cirsium arvense* (Canada thistle) in North Dakota. **Weed Science**, Ithaca, v. 54, p. 1080-1085, 2006.

STEWART JUNIOR, C. N.; VIA, L. E. A Rapid CTAB DNA Isolation Technique Useful for RAPD Fingerprinting and Other PCR Applications, **Bio Techniques**, Natick, v. 14, p. 748-749, 1993.

SUDHEER PAMIDIMARRI, 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, p. 1357-1364, 2009.

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

WEHAUSEN, J. D.; RAMEY, R. R.; IIE, C. W. Experiments in DNA extraction and PCR amplification from bighorn sheep feces: the importance of DNA extraction method. **Journal of Heredity**, Washington, DC, v. 95, n. 6, p. 503-509, 2004.

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M. A.; GELFAND, D. H.; SNINSKY, J. J.; WHITE, T. J. **PCR protocols: a guide to methods and applications**. New York: Academic Press, 1990. p. 315-322.

#### 4. RELAÇÕES GENÉTICAS ENTRE POPULAÇÕES DE PINHÃO MANSO BASEADAS NAS REGIÕES ITS

##### Resumo

Sequências gênicas podem ser utilizadas para estudos de diversidade genética e relações genéticas entre e dentro de espécies, dentre os quais se destacam as regiões dos Espaçadores Transcritos Internos (ITS) do DNA ribossomal nuclear (rDNA), por ser simples e abranger regiões transcritas mas não codificadoras que tendem a acumular mutações. O objetivo desse trabalho foi avaliar a diversidade genética entre 345 acessos de pinhão manso coletados em diversos locais e estados do Brasil e de outros países, agrupados em 51 populações e uma espécie de pinhão bravo, empregando amplificação, restrição e sequenciamento das regiões ITS do rDNA. O produto da amplificação das regiões ITS1 + 5.8S + ITS2 foi digerido separadamente com as enzimas *EcoRV* e *HinfI*. Para as 51 populações de pinhão manso, o produto da amplificação variou entre 630 e 810 pb. A análise através da técnica de PCR-RFLP, não se mostrou eficiente para a diferenciação das populações, porém os resultados corroboram com os obtidos pela amplificação. Para confirmar a origem dos polimorfismos detectados pela amplificação das regiões ITS, optou-se pelo sequenciamento desta região do rDNA. Foram clonados e sequenciados 14 haplótipos que apresentavam bandas com pesos moleculares diferentes. Foi sequenciado também um acesso de *J. pohliana* M. (pinhão bravo) como controle positivo. Para este estudo foram utilizadas sequências de ITS de outras Euphorbiaceas depositadas no *GenBank*, tais como: *J. integerrima*, *J. tanjorensis*, *J. gossypifolia*, *J. glandulifera*, *J. podagrica*, *Manihot esculenta*, *Ricinus communis*, *Croton helicoideus*, *Hevea brasiliensis* e a própria *J. curcas*. A análise das sequências das regiões ITS mostrou a existência de variação intragenômica entre os haplótipos estudados devido à presença de *indels* e substituições de bases. A árvore filogenética obtida com os haplótipos indicou a separação do acesso atóxico do México dos demais acessos tóxicos de pinhão manso, bem como a separação das demais espécies do gênero *Jatropha*, além da separação em clados diferentes das demais Euphorbiaceas. Os resultados demonstram a sensibilidade das regiões ITS para estudos genéticos para pinhão manso, além de abrir caminho para outros estudos genéticos, biogeográficos e evolutivos para esta espécie.

**Palavras-chave:** Divergência genética. Filogenia. rDNA. Regiões ITS. Populações.

## Abstract

Gene sequences can be used for studies of genetic diversity and genetic relationships among and within species, among which we highlight the regions of the Internal Transcribed Spacers (ITS) of nuclear ribosomal DNA (rDNA), for being simple and covering transcribed but not encoder regions that tend to accumulate mutations. The aim of this study was to evaluate the genetic diversity among 345 accessions of *Jatropha curcas* collected at sites in several locations and states in Brazil and other countries, grouped in 51 populations and a wild *Jatropha* species, using amplification, restriction and sequencing of the ITS regions of the rDNA. The product of amplification of the regions ITS1 + 5.8S + ITS2 was digested separately with the enzymes *EcoRV* and *HinfI*. For the 51 *Jatropha* populations, the amplification product ranged between 630 and 810 bp. The analysis by PCR-RFLP was not efficient for the differentiation of populations, but the results corroborate those obtained by amplification. To confirm the origin of the polymorphisms detected by amplification of the ITS regions, we chose to sequence this region of rDNA. Fourteen haplotypes that showed bands with different molecular weights were cloned and sequenced. An accession of *J. pohliana* M. (purging nut) was also sequenced as a positive control. For this study, ITS sequences from other Euphorbiaceas deposited in GenBank were used, such as *J. integerrima*, *J. tanzorensis*, *J. gossypifolia*, *J. glandulifera*, *J. podagrica*, *Manihot esculenta*, *Ricinus communis*, *Croton helicoideus*, *Hevea brasiliensis* and even *J. curcas*. The sequence analysis of ITS regions showed the existence of intragenomic variation among the haplotypes studied due to the presence of *indels* and base substitutions. The phylogenetic tree obtained with the haplotypes indicated the separation of the non-toxic Mexican accession from the other toxic *Jathopha* accessions as well as the separation of the other species of the genus *Jatropha*, and the separation of the other Euphorbiaceas into different clades. Results show the sensitivity of the ITS regions for *J. curcas* genetics studies, besides opening the way for other genetics, biogeographical and evolutionary studies for this species.

**Keywords:** Genetic divergency. Phylogeny. rDNA. ITS regions. Populations.

#### 4.1 Introdução

O pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) é uma planta que tem despertado interesse da comunidade científica, devido ao seu potencial para produção de biocombustíveis (CARELS, 2009). A necessidade de substituição dos combustíveis fósseis tem gerado uma busca de combustíveis limpos, sustentáveis e renováveis como os óleos vegetais. O pinhão manso se destaca dentre as demais oleaginosas pelas características do óleo que é produzido a partir de suas sementes, para a produção de biocombustíveis, cosméticos e biopesticidas (GUBITZ et al., 1999; KUMAR; SHARMA, 2008).

As informações sobre a cultura ainda são escassas, principalmente quanto às relações genéticas das populações. Segundo Carels et al. (2009), fósseis de sementes de pinhão manso foram encontrados no Peru, sugerindo que a espécie seja originária da América do Sul; no entanto, o estabelecimento do centro de origem, ou mesmo, diversidade da espécie dependerá caracterização genética das populações encontradas no continente americano e em outras partes do mundo.

As regiões dos Espaçadores Internos Transcritos (ITS1 e ITS2) do DNA ribossomal nuclear (rDNA) são comumente aplicadas em abordagens filogenéticas, por serem simples e abrangerem regiões transcritas mas não codificadoras, que tendem a acumular mutações. As regiões ITS acumulam mutações neutras mais rapidamente que as regiões codificantes e apresentam altas taxas de substituição nucleotídica (BALDWIN et al., 1995; FERREIRA; SOUZA-CHIES, 2005).

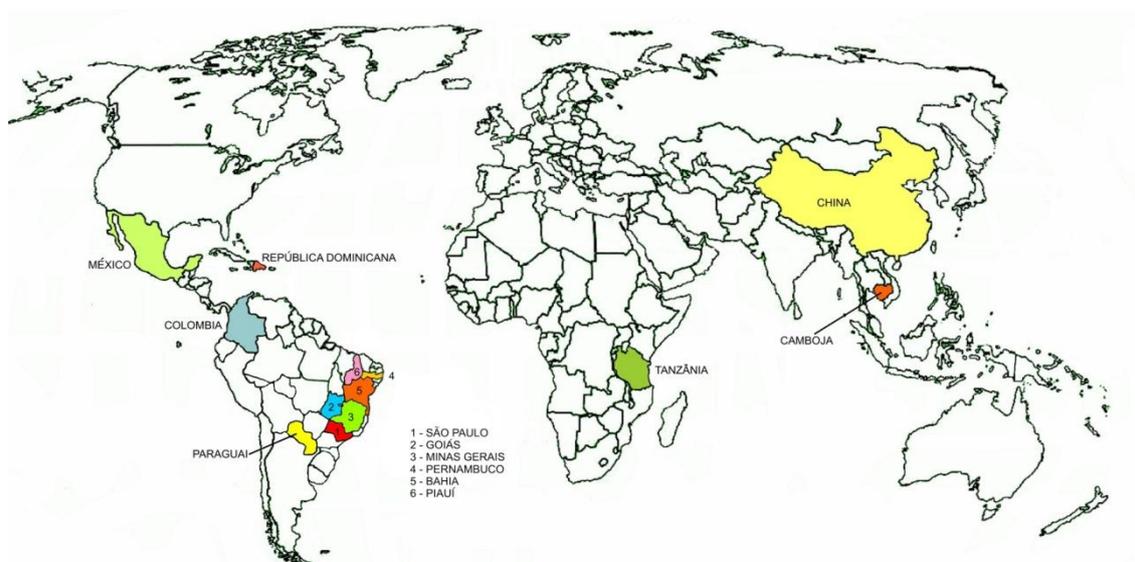
A amplificação, restrição e sequenciamento das regiões ITS têm sido utilizadas para as análises filogenéticas e estudos taxonômicos de espécies como trigo, cana-de-açúcar, arroz, amendoim e painço (HSIAO et al., 1994; AKAGI et al., 1997; CORDEIRO et al., 2003; NWAKANMA et al., 2003; SHU-PING et al., 2007; BECHARA et al., 2010; FUKUNAGA et al., 2011). Para o pinhão manso, Sudheer Pamadimarri et al. (2009a) utilizaram sequências do DNA ribossomal (ITS) para estudar filogeneticamente o gênero *Jatropha*, onde concluíram que as regiões gênicas ribossomais podem contribuir para estudos intra-específicos e biogeográfica, além de abrir caminho para estudos sobre a evolução da família *Euphorbiaceae*.

O objetivo desse trabalho foi compreender as relações genéticas entre populações de pinhão manso de diversos estados do Brasil e de outros países, empregando amplificação, restrição e sequenciamento das regiões ITS do rDNA.

## 4.2 Material e Métodos

### 4.2.1 Material Vegetal

As análises foram realizadas no Laboratório de Melhoramento de Plantas do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA-USP), Piracicaba – SP. O material vegetal empregado para as análises foi composto por 345 acessos de pinhão manso (Anexo A) e uma espécie de pinhão bravo (*Jatropha pohliana* M.), utilizada como controle, mantidos no banco de germoplasma do Laboratório de Fisiologia Vegetal e Cultura de Tecidos do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de São Carlos, Araras, SP. Estes acessos são originários de diversos estados brasileiros, e de países como México, Colômbia, República Dominicana, Paraguai, China, Camboja e Tanzânia (Figura 4.1, Anexo A). As amostras foram divididas em 51 populações de acordo com sua origem geográfica (Anexo A). As populações derivaram da coleta de uma mistura de sementes de árvores de cada localidade amostrada, visando obter a máxima variabilidade genética, com o menor número de amostras. Contudo, em alguns casos foram coletadas sementes de plantas isoladas. O acesso ‘JC230’, da população 36 do México (Anexo A), foi escolhido arbitrariamente dentre os acessos para ser utilizado como controle positivo em todos os géis.



**Figura 4.1** - Origem dos acessos de pinhão manso do banco de germoplasma da UFSCar

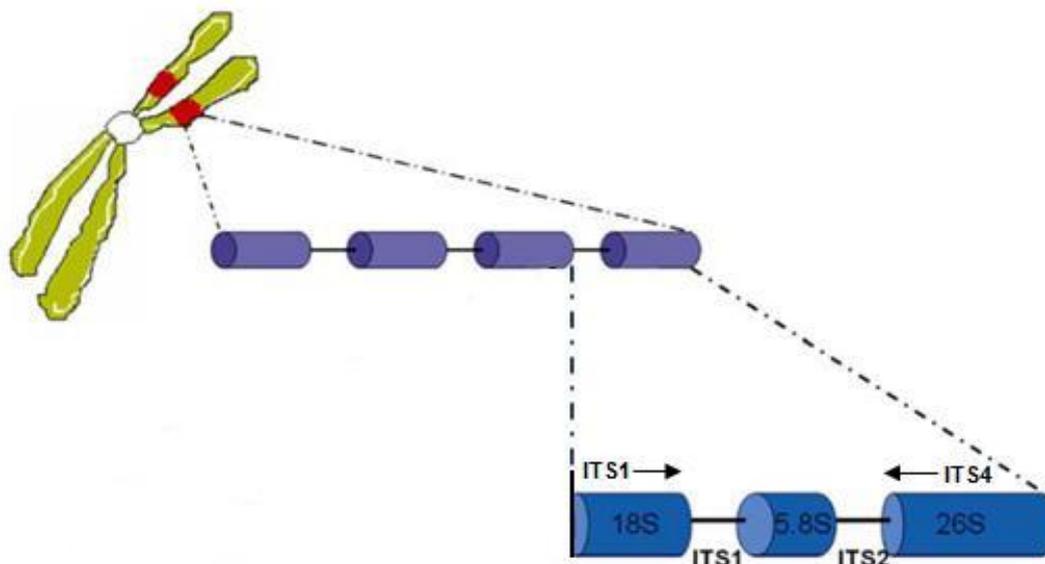
#### 4.2.2 Extração e quantificação do DNA

A extração e quantificação do DNA genômico dos acessos foram descritas com maiores detalhes no Capítulo 3, itens 3.2.3 e 3.2.5.

#### 4.2.3 Amplificação e análise das regiões ITS

A amplificação e análise das regiões ITS do rDNA foi descrita com maiores detalhes no Capítulo 3, item 3.2.6.

O produto da amplificação das regiões ITS1 + 5.8S + ITS2 (Figura 4.2) foi digerido separadamente com as enzimas *EcoRV* e *HinfI*. Cada reação de restrição continha 20 µL do produto de amplificação de ITS, 2 U de cada enzima, 2,5 µL de tampão específico da enzima, num volume total de 25 µL, sendo incubadas a 37°C por 3 h. A digestão do produto da amplificação das regiões de ITS foram separados por meio de eletroforese em gel 1,5 % agarose, em tampão Tris-Borato-EDTA (10X TBE: 0,89 M de Trisma-base; 0,86 M de Ácido Bórico, 0,02 M de EDTA, pH 8,0) a 5 V.cm<sup>-1</sup>, corados com *SYBRgold*. Após a eletroforese, os géis foram visualizados em luz UV (Ultra Violeta). A imagem do gel foi adquirida com câmera digital e processada com o programa Kodak Digital Science 1D (Kodak).



**Figura 4.2** - Região do DNA ribossomal amplificada por PCR pelos iniciadores ITS1 e ITS4 (Adaptado de POCZAI; HYVÖNEN, 2010)

#### 4.2.4 Seqüenciamento da região ITS

Para elucidar e confirmar a origem dos polimorfismos detectado pela amplificação das regiões ITS, optou-se pelo seqüenciamento desta região do rDNA. Foram clonados e seqüenciados 14 haplótipos que apresentavam bandas, com pesos moleculares diferentes, identificadas nos géis de agarose. Foi seqüenciado também um acesso de *Jatropha pohliana* M. (pinhão bravo) como controle positivo. Para tanto, três clones positivos de cada haplótipo foram clonados e sequenciados. Para o desenvolvimento dos estudos foi utilizado seqüências de ITS rDNA de outras Euphorbiaceas depositadas no *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) como a *Jatropha integerrima* (AY971261.1), *Jatropha tanjorensis* (EU881721.1), *Jatropha gossypifolia* (EU881726.1), *Jatropha glandulifera* (EU881726.1), *Jatropha podagrica* (EU881715.1), *Manihot esculenta* (AB441756.1), *Ricinus communis* (GQ478105.1), *Croton helicoideus* (EU586902.1), *Hevea brasiliensis* (AB441762.1) e a própria *Jatropha curcas* (AM774639.1).

Os produtos da amplificação foram confirmados, quantificados e posteriormente clonados no plasmídeo *pGEM-T Easy*, seguindo as especificações do Kit (Promega, WI, EUA). A ligação foi mantida a 8°C por 16 h. Após esse período, 2 µL da ligação foram transferidos para um tubo contendo células eletrocompetentes de *E. coli* (DH10B). As células transferidas para uma cubeta de 0,2 µm, previamente resfriada em gelo. A cubeta foi colocada no eletroporador (Micropulser – BioRad), e um pulso de corrente elétrica de 1,8 kV foi aplicado. Imediatamente, foi adicionado na cubeta 1 mL de meio SOC (20 g.L<sup>-1</sup> de triptona, 5 g.L<sup>-1</sup> de extrato de levedura, 0,5 g.L<sup>-1</sup> de NaCl, 10 mL.L<sup>-1</sup> de solução 250 mM KCl, 5 mL.L<sup>-1</sup> de solução 2 M MgCl<sub>2</sub> esterilizada, 20 mL.L<sup>-1</sup> de solução de 1 M glicose filtrada e esterilizada). Após a mistura, o conteúdo da cubeta foi transferido para um microtubo de 1,5 mL e foi mantido a 37°C durante 1 h, sob agitação constante. Em seguida, o microtubo foi ligeiramente centrifugado, por 5 min a 2.000 g, para a sedimentação das bactérias, e o sobrenadante foi descartado. O volume restante foi plaqueado em meio sólido LB (Luria-Bertani, composto por 10 g.L<sup>-1</sup> de triptona, 10 g.L<sup>-1</sup> de NaCl e 5 g.L<sup>-1</sup> de extrato de levedura) contendo ampicilina (100 µg mL<sup>-1</sup>), 40 µL de IPTG (isopropil β-D-galactopiranoside) 100 mM e 20 µL de X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactosideo) 50 mg.mL<sup>-1</sup>. As placas foram incubadas por 16 h em estufa a 37°C. Depois desse período, colônias brancas, que correspondem às bactérias transformadas com o vetor contendo o inserto de interesse foram selecionadas. Para

cada clone foi avaliada a presença do inserto através da amplificação utilizando os iniciadores universais SP6 e T7.

As colônias isoladas foram transferidas para tubos de ensaio contendo 5 mL de meio líquido LB com ampicilina ( $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), e mantidas sob agitação constante de 120 rpm a  $37^\circ\text{C}$  por 16 h. Após o crescimento das colônias, 1,5 mL do volume foi submetido à centrifugação a  $10.000 \text{ g}$  por 1 min, visando obter o DNA plasmidial. O sobrenadante foi descartado, sendo esse procedimento repetido por mais uma vez. Em seguida, o precipitado foi totalmente ressuscitado em 300  $\mu\text{L}$  de Solução I (50 mM glicose, 0,25 mM Tris-HCl pH 8,0 e 10 mM  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ) com a ajuda de um agitador, incubando-se a temperatura ambiente por 10 min. Após esse período, foi adicionado 300  $\mu\text{L}$  de Solução II (0,2 M NaOH e 1,0% SDS), misturando-se por inversão e incubando-se no gelo por 5 min. Em seguida, acrescentou-se 300  $\mu\text{L}$  de Solução III (3M KOAc pH 5,5), também misturando-se por inversão e incubando-se no gelo por 5 min. Posteriormente, realizou-se uma centrifugação por 10 min a  $10.000 \text{ g}$ , com isso transferindo-se o sobrenadante de cada tubo para microtubos novos, aos quais foram adicionados 500  $\mu\text{L}$  de isopropanol gelado. Os microtubos foram mantidos a  $-20^\circ\text{C}$  por 30 min, seguido de centrifugação a  $10.000 \text{ g}$  por 15 min a  $4^\circ\text{C}$ . Em seguida, o sobrenadante foi descartado e foi feita a lavagem do precipitado com 500  $\mu\text{L}$  de álcool 70%, submetidos à centrifugação de  $10.000 \text{ g}$  por 5 min a  $4^\circ\text{C}$ . Os microtubos foram deixados à temperatura ambiente até que as amostras secassem. Posteriormente, as amostras foram ressuscitadas em 50  $\mu\text{L}$  de TE (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 1 mM EDTA), contendo  $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de RNase e em seguida armazenado a  $-20^\circ\text{C}$ . A concentração do DNA plasmidial foi estimada por fluorimetria e confirmada em gel 1% agarose corado com *SYBRgold*.

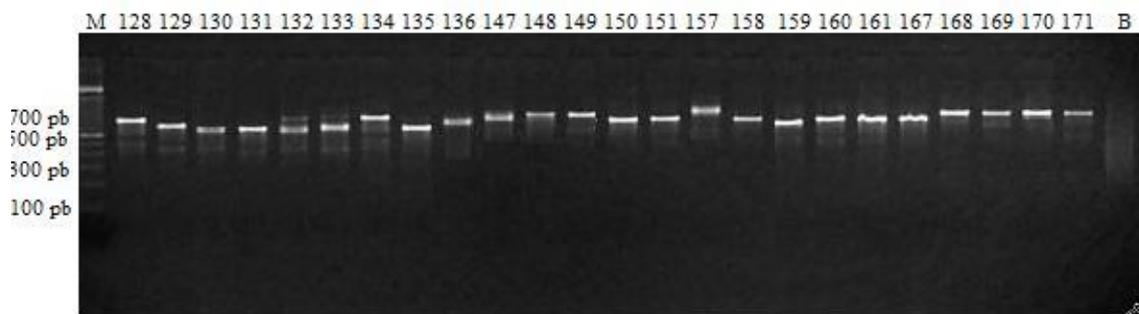
O sequenciamento foi realizado usando o protocolo padrão do kit *DyEnamic ET Terminator Cycle Sequencing* (GE Healthcare) e realizado no sequenciador ABI-3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA. EUA), no Laboratório de Biotecnologia Animal do Departamento de Zootecnia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo.

#### 4.2.5 Análise dos dados

Os cromatogramas do sequenciamento foram analisados quanto a qualidade e presença do vetor com o programa *Phred*, *Phrap* e *Consed* (<http://www.phrap.org/index.html>) e o alinhamento das sequências obtidas com iniciadores SP6 e T7 para cada clone foi realizado no programa CLUSTAL W - BioEdit (THOMPSON et al., 1994). A partir do alinhamento das sequências nos dois sentidos (SP6 e T7) foi gerada um consenso para cada clone, utilizando o programa BioEdit, e dos três clones para cada haplótipo obteve-se um consenso final. As sequências consenso finais foram comparadas por BLASTn com o banco de dados do *GenBank*. Para o alinhamento das sequências com um padrão disponível no banco de dados NCBI utilizou-se o programa MultiAlin (COPERT, 1988) e o resultado deste alinhamento foi utilizado para análise filogenética, baseado na análise *Máxima Parcimônia*, com base em 1000 réplicas de *bootstrap* com o auxílio do programa MEGA5.05 (TAMURA et al., 2011) para obtenção de árvore consensual que melhor representasse essas relações.

#### 4.3 Resultados e Discussão

O DNA ribossomal consiste em regiões do genoma altamente conservadas (18S, 5.8S e 26S), separadas por regiões variáveis (ITS1 e ITS2), por isso podem ser versáteis para buscar a história evolutiva em diferentes níveis taxonômicos (WHITE et al., 1990; HSIAO et al., 1994). Para as 51 populações de pinhão manso, o produto da amplificação variou entre 630 e 810 pares de base (pb) (Figura 4.3), comparável aos identificados durante o desenvolvimento do projeto para outras Euphorbiaceas, como a mamona (770 pb), mandioca (740 pb), seringueira (790 pb) e pinhão bravo (*Jatropha pohliana* M.) com 740 pb. Para arroz Takaiwo et al. (1985) encontrou um produto de 591 pb, em trigo 603 pb (HSIAO et al. 1994) e em *Musa* sp. 700 pb (NWAKANMA et al., 2003).



**Figura 4.3** - Amplificação das regiões ITS de alguns acessos de pinhão manso do banco de germoplasma. M: marcador 100 pb; 128: controle; Acessos (129 a 136 – Nova Porterinha, MG; 147 a 151 – Oracila/Janaúba, MG; 157 a 160 – Paraguaçu/Janaúba, MG; 167 a 171 – Bento/Janaúba, MG); B: branco

A partir da análise do polimorfismo de tamanho para a amplificação das regiões ITS (Tabela 4.1), foi observada a ocorrência de 14 tipos de haplótipos de acordo com o tamanho do fragmento amplificado nos géis, sendo que todos esses estavam presentes nas populações brasileiras e colombianas, demonstrando a existência de diversidade genética nas populações da América do Sul (Tabela 4.1). Alguns haplótipos observados nas populações sul americanas também foram encontrados nas populações da China, Camboja, México, Paraguai e Tanzânia (Tabela 4.1). Depois do Brasil e da Colômbia, o maior número de haplótipos diferentes foi encontrado na população do México (quatro) e o menor número nas populações do Paraguai (dois), China (dois), Camboja (dois), Tanzânia (um) e a República Dominicana com um haplótipo não encontrado nos países com maior diversidade (Tabela 4.1; Figura 4.4).

**Tabela 4.1** – Tamanhos dos fragmentos gerados pela amplificação e digestão das regiões ITS para as 51 populações de pinhão manso

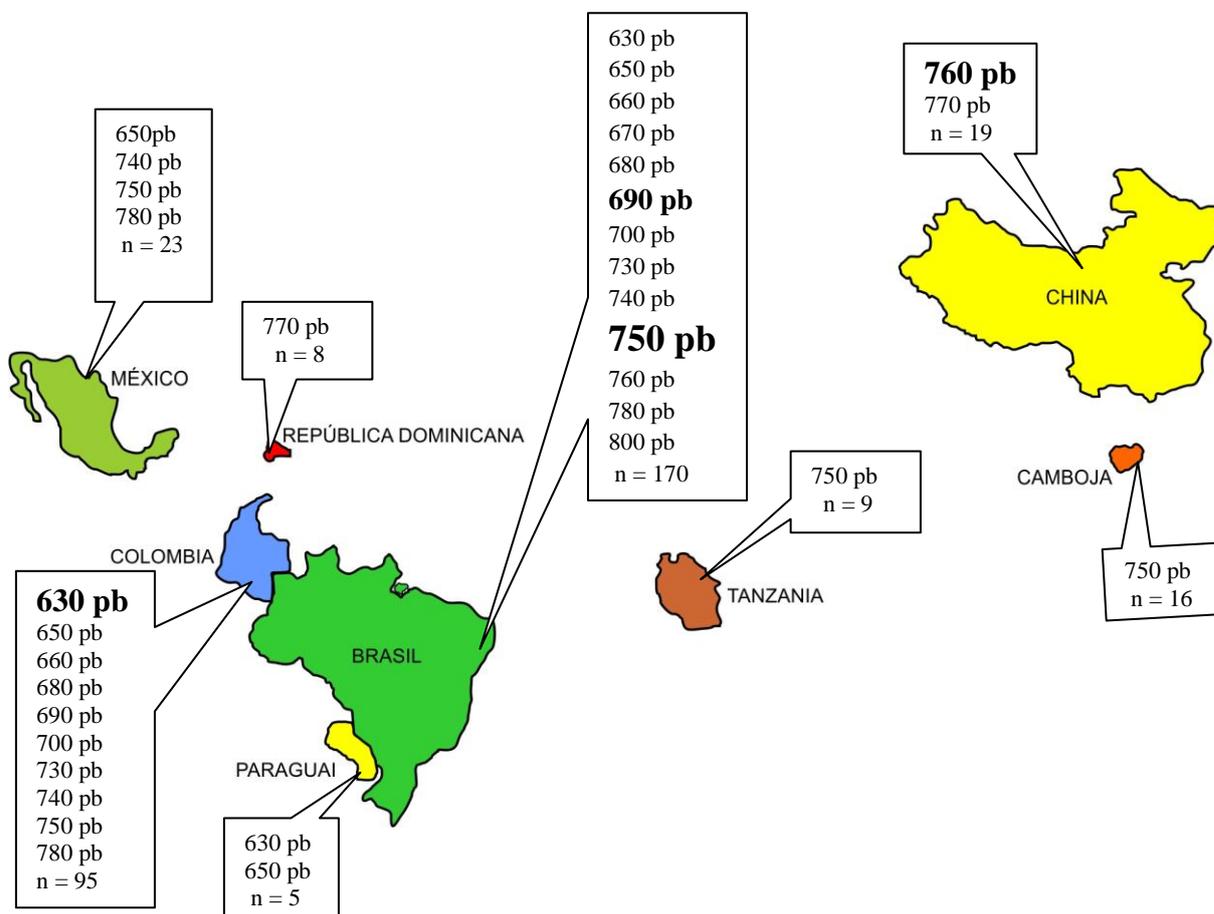
Origem	População	ITS (pb)	PCR-RFLP	
			<i>EcoRV</i> (pb)	<i>HinfI</i> (pb)
Lins-SP	Pop. 1	740	450/290	310/290/130
Lins-SP	Pop. 1	750	450/290	310/290/130
Holambra-SP	Pop. 2	750	450/290	310/290/130
Araras-SP	Pop. 3	700	410/230	310/300/110
Sta Rosa-SP	Pop. 4	660	410/230	300/270/110
Taubaté-SP	Pop. 5	750	450/290	310/290/130
CCA/Araras-SP	Pop. 6	760	470/270	310/290/130
Jales-SP	Pop. 7	650	420/360	310/220/100
SM Araguaia-GO	Pop. 8	690	460/270	310/220/100
Jussara-GO	Pop. 9	780	470/270	310/220/100
Itapirapuã-GO	Pop. 10	780	470/270	310/220/100
Britânia-GO	Pop. 11	760	470/270	320/210/130
MC de Goiás-GO	Pop. 12	800	450/330	350/230/110
Sta Vitória-MG	Pop. 13	750	450/290	310/220/100
Uberlândia-MG	Pop. 14	740	450/290	310/220/100
Janaúba-MG	Pop. 15	670	450/270	350/240/110
Oracila-MG	Pop. 16	700	410/230	310/300/110
Paraguaçu-MG	Pop. 17	730	420/250	310/220/100
Bento-MG	Pop. 18	730	420/250	310/220/100
Filomena-MG	Pop. 19	750	450/290	320/220/100
Torres-MS	Pop. 20	680	410/230	330/250/100
Pernambuco 1	Pop. 21	630	410/260	310/230/110
Pernambuco 2	Pop. 22	630	410/260	310/230/110
Irecê 1-BA	Pop. 23	690	460/270	300/220/100
Irecê 2-BA	Pop. 24	690	460/270	300/220/100
Cruz das Almas	Pop. 25	680	410/230	300/220/100
Barras-PI	Pop. 26	650	430/240	300/220/100
China-var.1	Pop. 27	770	410/350	340/230/110
China-var.2	Pop. 28	760	450/270	310/290/100

(continua)

(conclusão)

Origem	População	ITS (pb)	PCR-RFLP	
			<i>EcoRV</i> (pb)	<i>HinfI</i> (pb)
China-var.3	Pop.29	760	470/280	350/250/110
Camboja-1	Pop. 30	800	450/330	350/240/120
Tanzânia	Pop. 31	750	450/290	300/220/100
Rep. Dominicana	Pop. 32	770	410/330	300/220/100
Camboja-2	Pop. 33	780	470/280	300/220/100
Paraguai-1	Pop. 34	630	410/250	310/230/110
Paraguai-1	Pop. 34	650	430/230	310/230/100
Paraguai-2	Pop. 35	700	410/230	300/220/100
México-1	Pop. 36	740	440/290	300/220/100
México-2	Pop. 37	750	450/290	300/220/100
México-3	Pop. 38	780	480/290	300/220/100
México-4	Pop. 39	630	410/290	310/230/110
México-4	Pop. 39	650	420/360	310/230/110
Colômbia-1	Pop. 40	690	470/270	340/250/110
Colômbia-1	Pop. 40	700	420/230	310/230/110
Colômbia-2	Pop. 41	730	430/250	310/230/110
Colômbia-3	Pop. 42	680	410/230	310/230/110
Colômbia-4	Pop. 43	740	450/290	310/230/110
Colômbia-5	Pop. 44	650	410/350	300/230/100
Colômbia-5	Pop. 44	740	430/310	310/230/110
Colômbia-6	Pop. 45	680	410/230	310/230/110
Colômbia-6	Pop. 45	700	410/230	310/240/100
Colômbia-7	Pop. 46	630	420/260	310/230/110
Colômbia-8	Pop. 47	630	420/260	310/230/110
Colômbia-8	Pop. 47	650	420/360	310/230/130
Colômbia-9	Pop. 48	630	410/260	310/230/100
Colômbia-10	Pop. 49	660	430/240	300/270/110
Colômbia-11	Pop. 50	750	450/270	310/230/110
Colômbia-11	Pop. 50	780	470/280	310/230/110
Colômbia-12	Pop. 51	780	470/280	310/230/110

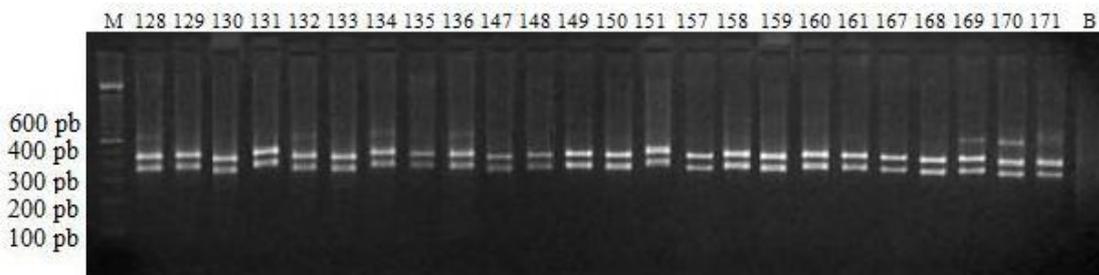
Os resultados obtidos com a amplificação das regiões ITS reforçam a hipótese de que o centro de diversidade do pinhão manso está localizado na América, como descrito por Ginwal et al. (2004), Kumar et al. (2009); Basha et al. (2009) e Sudheer Pamidimarri et al. (2009b; 2010).



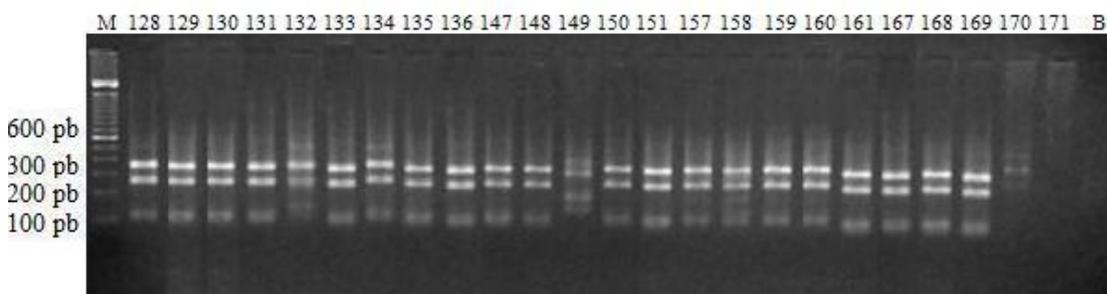
**Figura 4.4** – Presença dos haplótipos nos diferentes países. Tamanho das bandas indentificadas nos géis de agarose. Valores em destaque representam maior frequência do haplótipo; n é o número de acessos analisados

Na tentativa de explorar o polimorfismo potencial existentes nas sequências das regiões ITS, foi utilizada outra técnica baseada na clivagem dessas regiões com enzimas de restrição que diferem para sítio de reconhecimento (CAPS ou PCR-RFLP). A digestão com a enzima *EcoRV* gerou duas bandas, que variaram de tamanho entre 230 a 360 pb e de 410 a 480 pb para o outro (Tabela 4.1; Figura 4.5). Já a digestão com *Hinfi* gerou três bandas, sendo o primeiro com 100 a 130 pb, 210 a 300 pb para o segundo, e para o terceiro 300 a 350 pb (Tabela 4.1; Figura 4.6). A técnica da clivagem das regiões ITS foi utilizada para a identificação de espécies da subfamília *Iridoideae*, e conseguiram separar as espécies *Sisyrinchium setaceum*, *S. scariosum*, *S. micranthum*,

*Herbertia pulchella* e *Cypella* sp. utilizando as enzimas *AluI* e *HaeII* (SPIER et al., 2008). Nwakanna et al. (2003) conseguiram diferenciar *Musa acuminata* de *Musa balbisiana* utilizando endonucleases de restrição *HpaII* e *MspI*, para digerir fragmentos de ITS amplificados por PCR.



**Figura 4.5** - Restrição da região ITS pela endonuclease *EcoRV*. M: marcador 100 pb; Acessos (128 a 136 – Nova Porteira, MG; 147 a 151 – Oracila/Janaúba, MG; 157 a 160 – Paraguaçu/Janaúba, MG; 167 a 171 – Bento/Janaúba, MG); B: branco



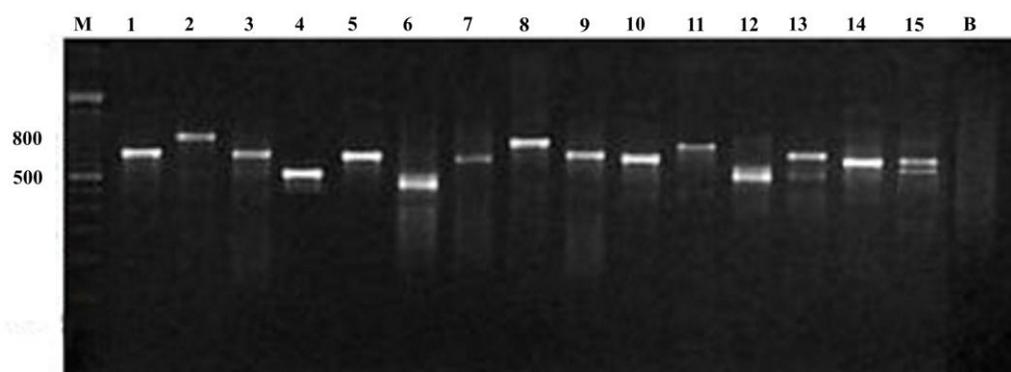
**Figura 4.6** - Restrição da região ITS pela endonuclease *HinfI*. M: marcador 100 pb; Acessos (128 a 136 – Nova Porteira, MG; 147 a 151 – Oracila/Janaúba, MG; 157 a 160 – Paraguaçu/Janaúba, MG; 167 a 171 – Bento/Janaúba, MG); B: branco

A análise através da técnica de PCR-RFLP das regiões ITS, não se mostrou eficiente para a diferenciação das populações, porém os resultados corroboram com os obtidos pela amplificação, onde foi demonstrada a existência de maior diversidade nas populações americanas. A ineficiência da técnica para a diferenciação das populações se deve ao número reduzido de endonucleases utilizadas neste estudo.

#### 4.4.1 Sequenciamento das regiões ITS

Para caracterizar a origem do polimorfismo detectado pela amplificação das regiões ITS, optou-se pelo sequenciamento desta região do rDNA, utilizando haplótipos

que representavam o perfil das bandas observado, que variaram de 630 a 800 pb (Tabela 4.3; Figura 4.7). Durante o sequenciamento verificou-se que o tamanho das bandas foi superestimado em alguns haplótipos (Tabela 4.3). A análise das sequências confirmou que os haplótipos apresentaram similaridade com a região do rDNA da sequência de *Jatropha curcas* (AM774639.1) depositada no *GenBank*, quando analisadas pelo programa BLASTn.



**Figura 4.7** - Amplificação das regiões ITS de 14 acessos utilizados no sequenciamento da região do rDNA. M: marcador 100 pb; Acessos (1 - Colômbia; 2 - Camboja; 3 - Brasil Bahia; 4 - Paraguai; 5 - Brasil, São Paulo [SP]; 6 - Brasil, Minas Gerais [MG]; 7 - Tanzânia; 8 - República Dominicana; 9 - Brasil, Pernambuco [PE]; 10 - México; 11 - Brasil, Goiás [GO]; 12 - Brasil, Mato Grosso do Sul [MS]; 13 - China; 14 - Brasil, Piauí [PI]; 15 - *Jatropha pohliana* M.; B: branco

O alinhamento entre a sequência dos haplótipos selecionados e os controles positivos (pinhão bravo e AM774639.1), resultou em 96% de identidade. O alinhamento das sequências dos haplótipos tóxicos com o mexicano, relatado como um atóxico, foi de 91%. Os marcadores RAPD revelaram a existência de 94,6% de similaridade entre as variedades tóxicas e não tóxicas (SUJATHA et al., 2005). Sudheer Pamidimarri et al. (2009b) também avaliaram variedades tóxicas e não tóxicas, e constataram que a similaridade entre as variedades variaram entre 90% quando empregado os marcadores AFLP e 92% para RAPD.

Os resultados demonstram a existência de variabilidade genética para as regiões ITS das populações de pinhão manso estudadas, quando comparadas com a sequência depositada para esta região no *GenBank*. Essa variação se deve à organização intrínseca das regiões ITS, onde o mecanismo da evolução em concerto promove o surgimento de

sequências variantes, originadas a partir de mutações pontuais de nucleotídeos ou por inserção ou deleção (BALDWIN et al., 1995; ALVAREZ; WENDEL, 2003). Este processo ajuda a explicar a presença de bandas com pesos moleculares diferentes nas populações de pinhão manso estudadas.

A análise das sequências das regiões ITS mostrou a existência de variação intragenômica entre os haplótipos estudados devido à presença de *indels* e substituições de bases. Durante o alinhamento das sequências de pinhão manso ficou evidente o surgimento de mutações dentro das regiões ITS do rDNA, como por exemplo: o nucleotídeo Timina (T) foi inserido na sequência Brasil-MS e República Dominicana nas posições 61 e 73; Brasil-GO na posição 189; Brasil-MG na posição 375; Camboja, China e Colômbia na posição 563 (Figura 4.8). A adição do nucleotídeo C (Citosina) foi observada nas sequências da Tanzânia, Camboja, Brasil-SP, Brasil-PI e México na posição 219 (Figura 4.8). A adenina foi inserida nas sequências Brasil-PE e China na posição 415 e Tanzânia na posição 517 (Figura 4.8). O nucleotídeo G (Guanina) foi inserido na sequência Camboja na posição 217. Na posição 375 a guanina foi inserida nas sequências do Camboja, Paraguai, Brasil-SP, Brasil-MS, Colômbia e Brasil-PE, na posição 491 para Camboja e China, e nas posições 561 e 585 para a sequência do Camboja. A guanina também está presente na posição 585 para a sequência Brasil-PE e na posição 678 para Tanzânia e República Dominicana (Figura 4.8). No haplótipo mexicano foi inserido na sequência um conjunto de bases (TGTCACGCAACGTCGCTCCCACCCCGTGG) entre as posições 463 e 491, tornando evidente a separação dos haplótipos tóxicos do atóxico (Figura 4.8).

De posse dos resultados do seqüenciamento confirmou-se o número de haplótipos e que esses possuem o tamanho variando de 635 a 725 pb (Tabela 4.2). Analisando a Tabela 4.2, verifica-se que as sequências Brasil-PI, Brasil-BA e Tanzânia, possuem o mesmo tamanho (718 pb), porém com variações intragenômicas. O mesmo fato acontece com as sequências do Paraguai e Colômbia que possuem 719 pb.

**Tabela 4.2** - Haplótipos utilizados para o sequenciamento das regiões ITS do rDNA e seus tamanhos

<b>Haplótipo</b>	<b>População</b>	<b>Origem</b>	<b>Tamanho (pb) Amplificação</b>	<b>Tamanho (pb) seqüenciamento</b>
JC144	Pop. 22	Brasil - PE	630	708
JC168	Pop. 26	Brasil - PI	650	718
JC224	Pop. 35	Paraguai	660	719
JC118	Pop. 18	Brasil - MG	670	635
JC126	Pop. 20	Brasil - MS	680	721
JC154	Pop. 24	Brasil - BA	690	718
JC036	Pop.06	Brasil - SP	700	722
JC238	Pop. 38	México	730	702
JC342	Pop. 51	Colômbia	740	719
JC203	Pop. 31	Tanzânia	750	718
JC0178	Pop. 28	China	760	723
JC213	Pop. 32	Rep. Dominicana	770	717
JC043	Pop. 08	Brasil - GO	780	720
JC194	Pop. 30	Camboja	800	725

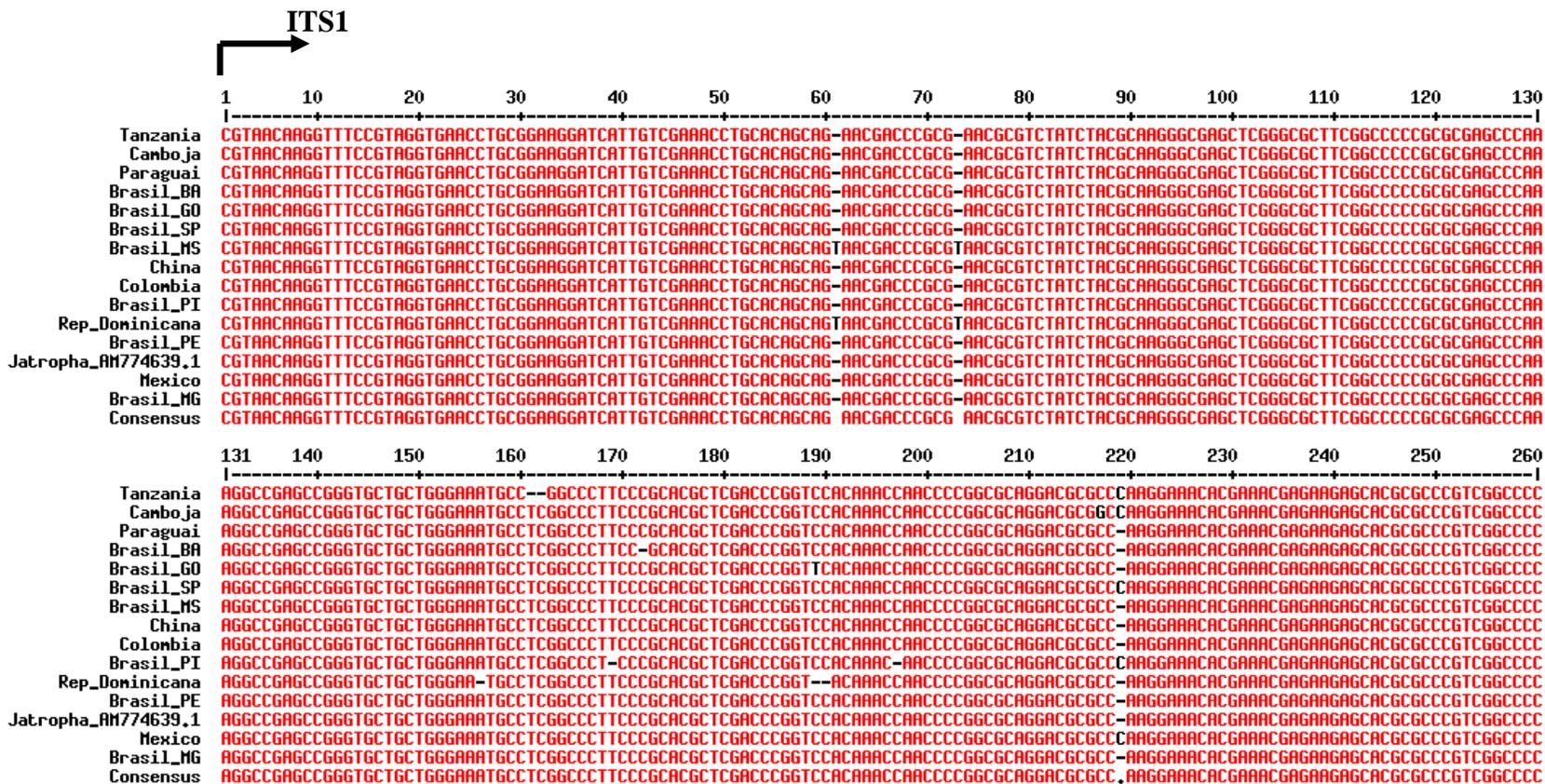
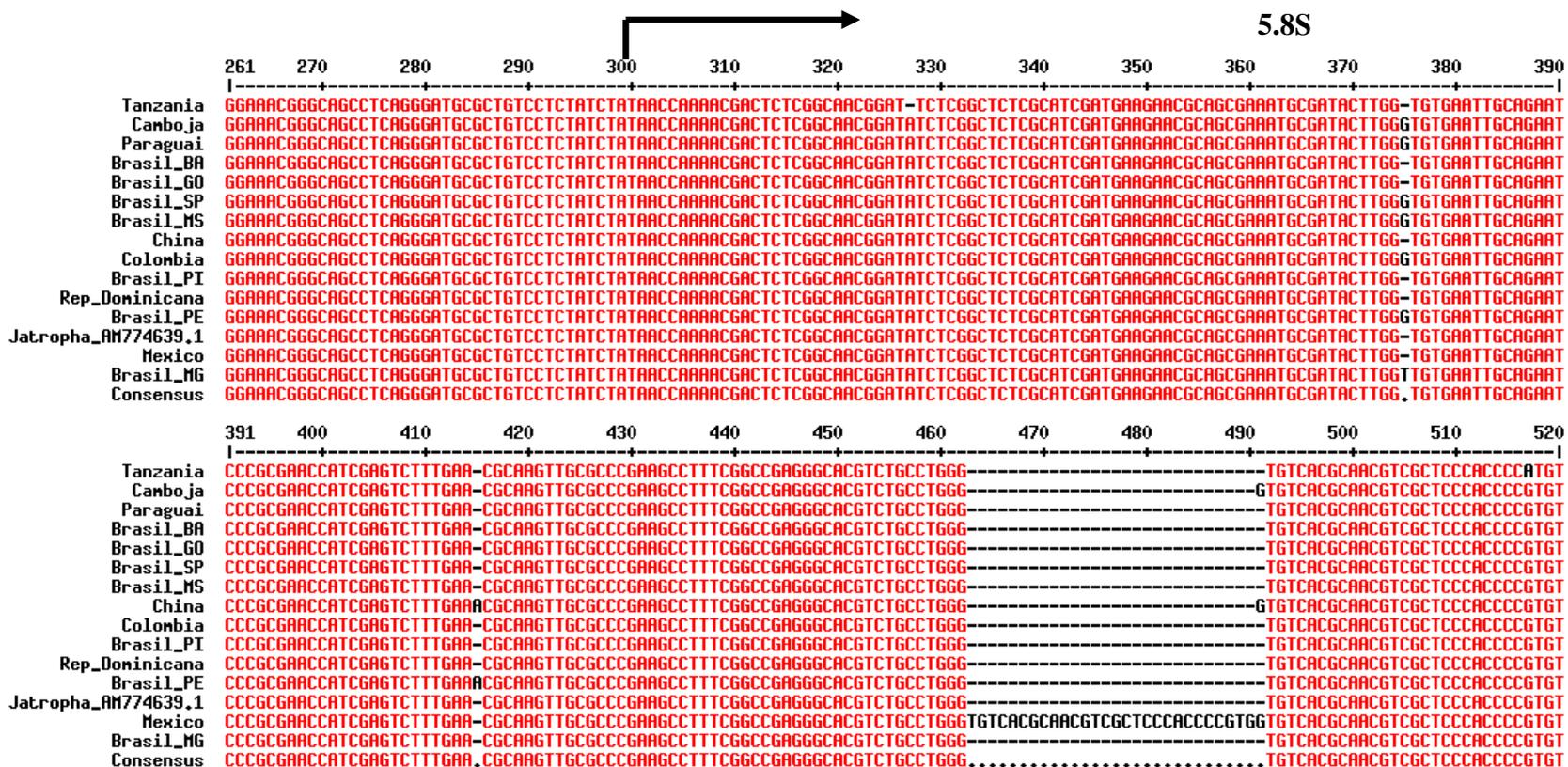


Figura 4.8 – Alinhamento dos haplótipos sequenciados comparados com a sequência referência (AM774639.1)

(continua)

(continuação)



(continua)

(conclusão)

521 530 540 550 560 570 580 590 600 610 620 630 640 650

Tanzania GGGGGCGGATTCTGGCCCTCCGTCGCGCCGGTCGGCCGCGGTT-GGCCCAAAGCCTAGTCCCCGG-CTGCGAATGCCACGACAAATCGGTGGTTGTAAAGACCTCGGACACGGTCGTGCGCGGACGCACGC  
Camboja GGGGGCGGATTCTGGCCCTCCGTCGCGCCGGTCGGCCGCGGTTGGCCCAAAGCCTAGTCCCCGGCTGCGA-TGCCACGACAAATCGGTGGTTGTAAAGACCTCGGACACGGTCGTGCGCGGACGCACGC  
Paraguai GGGGGCGGATTCTGGCCCTCCGTCGCGCCGGTCGGCCGCGGTT-GGCCCAAAGCCTAGTCCCCGG-CTGCGAATGCCACGACAAATCGGTGGTTGTAAAGACCTCGGACACGGTCGTGCGCGGACGCACGC  
Brasil\_BA GGGGGCGGATTCTGGCCCTCCGTCGCGCCGGTCGGCCGCGGTT-GGCCCAAAGCCTAGTCCCCGG-CTGCGAATGCCACGACAAATCGGTGGTTGTAAAGACCTCGGACACGGTCGTGCGCGGACGCACGC  
Brasil\_G0 GGGGGCGGATTCTGGCCCTCCGTCGCGCCGGTCGGCCGCGGTT-GGCCCAAAGCCTAGTCCCCGG-CTGCGAATGCCACGACAAATCGGTGGTTGTAAAGACCTCGGACACGGTCGTGCGCGGACGCACGC  
Brasil\_SP GGGGGCGGATTCTGGCCCTCCGTCGCGCCGGTCGGCCGCGGTT-GGCCCAAAGCCTAGTCCCCGG-CTGCGAATGCCACGACAAATCGGTGGTTGTAAAGACCTCGGACACGGTCGTGCGCGGACGCACGC  
Brasil\_MS GGGGGCGGATTCTGGCCCTCCGTCGCGCCGGTCGGCCGCGGTT-GGCCCAAAGCCTAGTCCCCGG-CTGCGAATGCCACGACAAATCGGTGGTTGTAAAGACCTCGGACACGGTCGTGCGCGGACGCACGC  
China GGGGGCGGATTCTGGCCCTCCGTCGCGCCGGTCGGCCGCGGTTGGCCCAAAGCCTAGTCCCCGG-CTGCGAATGCCACGACAAATCGGTGGTTGTAAAGACCTCGGACACGGTCGTGCGCGGACGCACGC  
Colombia GGGGGCGGATTCTGGCCCTCCGTCGCGCCGGTCGGCCGCGGTTGGCCCAAAGCCTAGTCCCCGG-CTGCGAATGCCACGACAAATCGGTGGTTGTAAAGACCTCGGACACGGTCGTGCGCGGACGCACGC  
Brasil\_PI GGGGGCGGATTCTGGCCCTCCGTCGCGCCGGTCGGCCGCGGTT-GGCCCAAAGCCTAGTCCCCGG-CTGCGAATGCCACGACAAATCGGTGGTTGTAAAGACCTCGGACACGGTCGTGCGCGGACGCACGC  
Rep\_Dominicana GGGGGCGGATTCTGGCCCTCCGTCGCGCCGGTCGGCCGCGGTT-GGCCCAAAGCCTAGTCCCCGG-CTGCGAATGCCACGACAAATCGGTGGTTGTAAAGACCTCGGACACGGTCGTGCGCGGACGCACGC  
Brasil\_PE GGGGGCGGATTCTGGCCCTCCGTCGCGCCGGTCGGCCGCGGTT-GGCCCAAAGCCTAGTCCCCGG-CTGCGAATGCCACGACAAATCGGTGGTTGTAAAGACCTCGGACACGGTCGTGCGCGGACGCACGC  
Jatropha\_AM774639.1 GGGGGCGGATTCTGGCCCTCCGTCGCGCCGGTCGGCCGCGGTT-GGCCCAAAGCCTAGTCCCCGG-CTGCGAATGCCACGACAAATCGGTGGTTGTAAAGACCTCGGACACGGTCGTGCGCGGACGCACGC  
Mexico GGGGGCGGATTCTGGCCCTCCGTCGCGCCGGTCGGCCGCGGTT-GGCCCAAAGCCTAGTCCCCGG-CTGCGAATGCCACGACAAATCGGTGGTTGTAAAGACCTCGGACACGGTCGTGCGCGGACGCACGC  
Brasil\_MG GGGGGCGGATTCTGGCCCTCCGTCGCGCCGGTCGGCCGCGGTT-GGCCCAAAGCCTAGTCCCCGG-CTGCGAATGCCACGACAAATCGGTGGTTGTAAAGACCTCGGACACGGTCGTGCGCGGACGCACGC  
Consensus GGGGGCGGATTCTGGCCCTCCGTCGCGCCGGTCGGCCGCGGTTGGCCCAAAGCCTAGTCCCCGGCTGCGAATGCCACGACAAATCGGTGGTTGTAAAGACCTCGGACACGGTCGTGCGCGGACGCACGC

651 660 670 680 690 700 710 720 730 740 750 755

Tanzania CCCGGAAATCGAGACCCCTCTGCGTCCCTAAGGGCACGCTCCCATCGCGACCCAGGTCAGGCGGGACTACCCGCTGAGTTTAAAGCATATCAATAAGCGGAGGA  
Camboja CCCGGAAATCGAGACCCCTCTGCGTCCCTAAGGGCACGCTCCCATCGCGACCCAGGTCAGGCGGGACTACCCGCTGAGTTTAAAGCATATCAATAAGCGGAGGA  
Paraguai CCCGGAAATCGAGAC---TCTGCGTCCCTAAGGGCACGCTCCCATCGCGACCCAGGTCAGGCGGGACTACCCGCTGAGTTTAAAGCATATCAATAAGCGGAGGA  
Brasil\_BA CCCGGAAATCGAGACCCCTCTGCGTCCCTAAGGGCACGCTCCCATCGCGACCCAGGTCAGGCGGGACTACCCGCTGAGTTTAAAGCATATCAATAAGCGGAGGA  
Brasil\_G0 CCCGGAAATCGAGACCCCTCTGCGTCCCTAAGGGCACGCTCCCATCGCGACCCAGGTCAGGCGGGACTACCCGCTGAGTTTAAAGCATATCAATAAGCGGAGGA  
Brasil\_SP CCCGGAAATCGAGACCCCTCTGCGTCCCTAAGGGCACGCTCCCATCGCGACCCAGGTCAGGCGGGACTACCCGCTGAGTTTAAAGCATATCAATAAGCGGAGGA  
Brasil\_MS CCCGGAAATCGAGACCCCTCTGCGTCCCTAAGGGCACGCTCCCATCGCGACCCAGGTCAGGCGGGACTACCCGCTGAGTTTAAAGCATATCAATAAGCGGAGGA  
China CCCGGAAATCGAGACCCCTCTGCGTCCCTAAGGGCACGCTCCCATCGCGACCCAGGTCAGGCGGGACTACCCGCTGAGTTTAAAGCATATCAATAAGCGGAGGA  
Colombia CCCGGAAATCGAGACCCCTCTGCGTCCCTAAGGGCACGCTCCCATCGCGACCCAGGTCAGGCGGGACTACCCGCTGAGTTTAAAGCATATCAATAAGCGGA  
Brasil\_PI CCCGGAAATCGAGACCCCTCTGCGTCCCTAAGGGCACGCTCCCATCGCGACCCAGGTCAGGCGGGACTACCCGCTGAGTTTAAAGCATATCAATAAGCGGAGGA  
Rep\_Dominicana CCCGGAAATCGAGACCCCTCTGCGTCCCTAAGGGCACGCTCCCATCGCGACCCAGGTCAGGCGGGACTACCCGCTGAGTTTAAAGCATATCAATAAGCGGAGGA  
Brasil\_PE CCCGGAAATCGAGACCCCTCTGCGTCCCTAAGGGCACGCTCCCATCGCGACCCAGGTCAGGCGGGACTACCCGCTGAGTTTAAAGCATATCAATAAGCGGAGGA  
Jatropha\_AM774639.1 CCCGGAAATCGAGACCCCTCTGCGTCCCTAAGGGCACGCTCCCATCGCGACCCAGGTCAGGCGGGACTACCCGCTGAGTTTAAAGCATATCAATAAGCGGAGGA  
Mexico CCCGGAAATCGAGACCCCTCTGCGTCCCTAAGGGCACGCTCCCATCGCGACCCAGGTCAGGCGGGACTACCCGCTGAGTTTAAAGCATATCAATAAGCGGAGGA  
Brasil\_MG CGCATATCAATAAG-----CGGAGGA  
Consensus CcCggaAaCaTcgaGaccctCtGcGtccctaagggcacgctcccatcgcgacccaggtcagggcggg..taccgct.....



Estudos de comparação da sequência das regiões ITS do rDNA foram utilizados para avaliar as relações filogenéticas em vários níveis taxonômicos e também para descrever a estrutura genética das populações (WHITE et al., 1990; FIGUEIRA et al., 1994; HSIAO et al., 1994; AKAGI et al., 1997; CORDEIRO et al., 2003; NWAKANMA et al., 2003; SHU-PING et al., 2007; SUDHEER PAMIDIMARRI et al., 2009a). Desta forma, buscou-se relacionar filogeneticamente pelo método de *Máxima Parcimônia*, com bootstrap para 1000 replicatas no programa MEGA5.05 (TAMURA et al., 2011), os haplótipos selecionados, além de um pinhão bravo e 10 sequências disponíveis no *GenBank* para outras Euphorbiaceas das regiões ITS: *Jatropha integerrima*, *J. tanjorensis*, *J. gossypifolia*, *J. glandulifera*, *J. podagrica*, *Manihot esculenta*, *Ricinus communis*, *Croton helicoideus*, *Hevea brasiliensis* e *Jatropha curcas*.

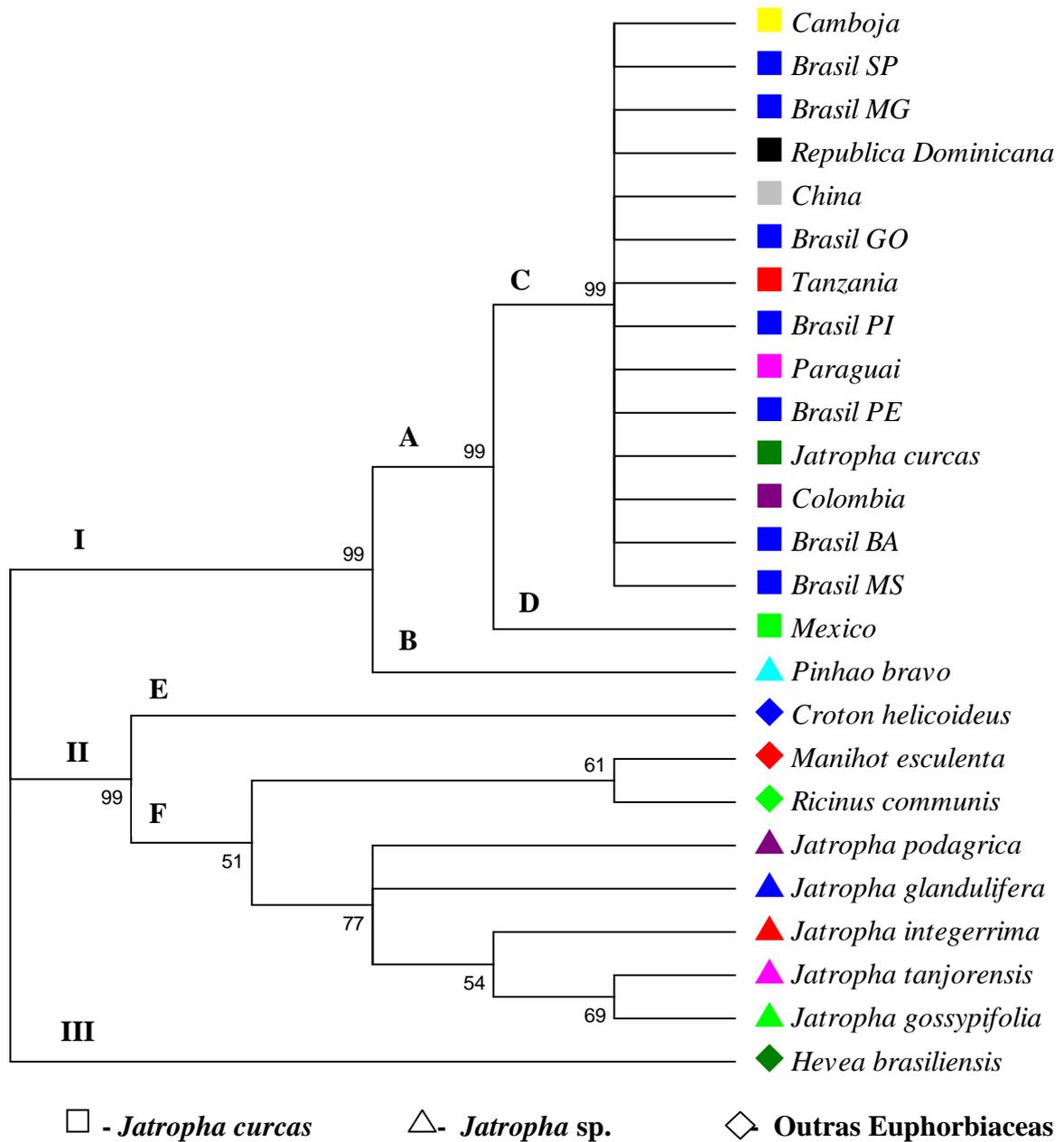
A árvore consenso foi obtida a partir de 57 árvores mais parcimoniosas, com um índice de consistência (IC) igual a 0,78, o que indica boa topologia da árvore, índice de retenção de 0,44 e o índice composto para todos os sítios informativos. A árvore apresentou três grupos monofiléticos com valor de bootstrap de 100%, sendo o primeiro (grupo I) composto pelos haplótipos de pinhão manso, além da sequência de *Jatropha curcas* (AM774639.1) e o pinhão bravo (Figura 4.9). No grupo II ficaram as outras espécies de *Jatropha*, além de *Manihot esculenta*, *Ricinus communis* e *Croton helicoideus* (Figura 4.9). E no grupo III ficou a espécie *Hevea brasiliensis* (Figura 4.9).

No grupo I, observa-se a separação dos haplótipos de pinhão manso e *Jatropha curcas* no sub-clado (A). No sub-clado B ficou o pinhão bravo. No sub-clado C verifica-se a formação de uma politomia, ou seja, todos os haplótipos de pinhão manso e a sequência de *Jatropha curcas* partem de um só nó. Desta forma, pode-se inferir que a árvore está parcialmente resolvida, pois cada um dos haplótipos e o controle apresentam uma relação de ancestralidade e não descendem de um único ancestral comum (Figura 4.9). O fenômeno da politomia é relativamente comum para o marcador ITS entre indivíduos de mesma espécie, pois se trata de uma região conservada do rDNA. A exceção é o haplótipo mexicano que formou um sub-clado (D) com 99% de confiabilidade, contudo, continua compartilhando o mesmo ancestral comum. O haplótipo mexicano apresenta variação genética significativa para as regiões ITS, desta forma, é o mais distante filogeneticamente dos haplótipos tóxicos. Pode-se considerar a separação dos haplótipos tóxicos do atóxico como uma característica derivada, ainda que, o ancestral comum já compartilhava desta característica (Figura 4.9).

A separação de acessos tóxicos e atóxicos por meio de marcadores moleculares foi relatado por Basha e Sujatha (2007), onde 83% dos acessos indianos avaliados foram

agrupados em dois grandes grupos, enquanto que o acesso mexicano formou um grupo unitário. Yaowalak et al. (2011) também conseguiram separar os acessos mexicanos (não tóxicos) dos tóxicos cultivados no sudeste asiático.

No grupo II, observa-se a formação de dois sub-clados. No primeiro sub-clado (E) encontra-se a Euphorbiacea *Croton helicoideus* e no segundo (F) as espécies de pinhão bravo, além das Euphorbiaceas *Manihot esculenta*, *Ricinus communis* (Figura 4.9).



**Figura 4.9** – Árvore filogenética baseada na comparação das regiões ITS1 – 5.8S –ITS2 do rDNA de haplótipos de pinhão manso e sequências de outras Euphorbiáceas disponíveis no *GenBank* (*Jatropha integerrima* - AY971261.1, *Jatropha tanjorensis* - EU881721.1, *Jatropha gossypifolia* - EU881726.1, *Jatropha glandulifera* - EU881726.1, *Jatropha podagrica* - EU881715.1, *Manihot esculenta* - AB441756.1, *Ricinus communis* - GQ478105.1, *Croton helicoideus* - EU586902.1, *Hevea brasiliensis* - AB441762.1 e *Jatropha curcas* - AM774639.1). Os agrupamentos foram calculados pelo método de *Máxima Parcimônia* (MP). Os dados nos ramos indicam valores de bootstrap, com um total de 1000 replicações, sendo apresentados valores maiores do que 50. Identificação dos haplótipos e espécies na figura

#### 4.4 Conclusão

A análise das regiões ITS permitiu detectar a presença de polimorfismo entre populações de pinhão manso, além de abrir caminho para outros estudos genéticos, biogeográficos e evolutivos para esta espécie. Através da análise genética também foi possível separar os haplótipos tóxicos do atóxico.

#### Referências

AKAGI, H.; YOKOZEKI, Y.; INAGAKI, A.; FUJIMURA, T. Highly polymorphic microsatellites of Rice Consist of AT repeats, and a classification of closely related cultivars with these microsatellite loci. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 94, p. 61-67, 1997.

ÁLVAREZ, I.; WENDEL, J. F. Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, San Diego, v. 29, p. 417-434, 2003.

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

BALDWIN, B. G.; SANDERSON, M. J.; PORTER, J. M.; WOJCIECHOWSKI, M. F.; CAMPBELL, C. S.; DONOGHUE, M. J. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, St.Louis, v. 82, p. 247-277, 1995.

BECHARA, M. D.; MORETZSOHN, M. C.; PALMIERI, D. A.; MONTEIRO, J. P.; BACCI JR, M.; MARTINS JR, J.; VALLS, J. F. M.; LOPES, C. R.; GIMENES, M. A. Phylogenetic relationships in genus *Arachis* based on ITS and 5.8S rDNA sequences. **BMC Plant Biology**, London, v. 10, p. 255, 2010.

CARELS, N. *Jatropha curcas*: a review. **Advances in Botanical Research**, London, v. 50, p. 40-86, 2009.

CORPET, F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. **Nucleic Acids Research**, London, v. 16, n. 22, p. 10881-10890, 1988.

CORDEIRO, G. M.; PAN, Y.- B.; HENRY, R. Sugarcane microsatellites for the assessment of genetic diversity in sugarcane germplasm. **Plant Science**, Amsterdam, v. 165, p. 181-189, 2003.

FERREIRA, T. F.; SOUZA-CHIES, T. T. Genetic diversity among *Paspalum* L. species (*Poaceae*) belonging to the *Notata* and *Linearia* groups based on restriction fragment length polymorphism analyses. **Genetica**, Dordrecht, v. 125, p. 133-140, 2005.

FIGUEIRA, A.; JANICK, J.; LEVY, M.; GOLDSBROUGH, P. B. Reexamining the classification of *Theobroma cacao* L. using molecular markers. **Journal of American Society for Horticultural Science**, Geneva, v. 119, p. 1073-1082, 1994.

FUKUNAGA, K.; ICHITANI, K.; KAWASE, M. rDNA polymorphism of foxtail millet (*Setaria italica* ssp. *italica*) landraces in northern Pakistan and Afghanistan and in its wild ancestor (*S. italica* spp. *viridis*). **Genetic Resource Crop Evolution**, Heidelberg, v. 58, p. 825-830, 2011.

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

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

HSIAO, C.; CHATTERTON, N. J.; ASAY, K. H.; JENSEN, K. B. Phylogenetic relationships of the internal transcribed spacer region in the nuclear ribosomal DNA in monocots. **Genome**, Ottawa, v. 37, p. 112-120, 1994.

KUMAR, A.; SHARMA, S. An evaluation of multipurpose oil seed crop for industrial uses (*Jatropha curcas* L.): A review. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 28, p. 1-10, 2008.

KUMAR, R. V.; TRIPATHI, Y. K.; SHUKLA, P.; AHLAWAT, S. P.; GUPTA, V. K. Genetic diversity and relationships among germplasm of *Jatropha curcas* L. revealed by RAPDs. **Trees – Structure and Function**, Heidelberg, v. 23, n. 5, p. 1075 – 1079, 2009.

NWAKANMA, D. C.; PILLAY, M.; OKOLI, B. E.; TENKOUANO, A. PCR-RFLP of the ribosomal DNA internal transcribed spacers (ITS) provides markers for the A and B genomes in *Musa* L. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 108, p. 154-159, 2003.

POCZAI, P.; HYVÖNEN, J. Nuclear ribosomal spacer regions in plant phylogenetics: problems and prospects. **Molecular Biology Reports**, Dordrecht, v. 37, p. 1897-1912, 2010.

SHU-PING, N.; XU, L.-B.; LU, Y.; HUANG, B.-Z.; GE, X.-J. Genome composition and genetic diversity of *Musa* germplasm from China revealed by PCR-RFLP and SSR markers. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 114, p. 281-288, 2007.

SPIER, F. F.; TACAUATIÁ, L. O.; AGOSTINI, G.; EGGERS, L.; SOUZA-CHIES, T. T. Uso de marcadores PCR-RFLP como ferramenta na identificação de espécies da subfamília Iridoideae (Iridaceae) presentes no Parque Estadual de Itapuã, Viamão, RS, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 6, p. 159-165, 2008.

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 Regulation**, Dordrecht, v. 47, p. 83-90, 2005.

SUDHEER PAMIDIMARRI, D. V. N.; CHATTOPADHYAY, B.; REDDY, M. P. Genetic divergence and phylogenetic analysis of genus *Jatropha* based on nuclear ribosomal DNA ITS sequence. **Molecular Biology Reports**, Dordrecht, v. 36, p. 1929-1935. 2009a.

SUDHEER PAMIDIMARRI, D. V. N.; 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, p. 1357-1364, 2009b.

SUDHEER, D.V.N.P.; MASTAN, S.G.; RAHMAN, H.; RAVI PRAKASH, C.; SINGH, S.; REDDY, M.P. Cross species amplification ability of novel microsatellites isolated from *Jatropha curcas* and genetic relationship with sister taxa. **Molecular Biology Reports**, Dordrecht, v. 38, p. 1383-1388, 2010.

TAKAIWO, F.; OONO, K., SUGIURA, M. Nucleotide sequence of the 17S-25S spacer region from rice rDNA. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 4, p. 355-364, 1985.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, London, v. 22, p. 4673-4680, 1994.

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M.A. et al. **PCR protocols: a guide to methods and applications**. New York: Academic Press, 1990. p. 315-322.

## 5. DESENVOLVIMENTO DE INICIADORES MICROSSATÉLITES PARA *Jatropha curcas* (EUPHORBIACEAE) E SUA TRANSFERIBILIDADE PARA CONGÊNERES

### Resumo

O pinhão manso é uma planta oleaginosa perene que produz sementes com alto conteúdo de óleo. Sua importância comercial aumentou nos últimos anos com a substituição dos combustíveis fósseis por biocombustíveis, porém a falta de cultivares comerciais e os problemas com pragas e doenças estão desestimulando o cultivo. O desenvolvimento de marcadores moleculares pode auxiliar na busca por cultivares adaptadas as necessidades dos agricultores. Os microssatélites são a classe mais informativa dentre os marcadores genéticos. Este trabalho teve como objetivo desenvolver marcadores microssatélites a partir de uma biblioteca genômica enriquecida para pinhão manso e testar a transferibilidade dos iniciadores para outras Euphorbiaceas, tais como, mandioca, seringueira e mamona, como também para outras espécies do gênero *Jatropha* (pinhão roxo e pinhão bravo). A biblioteca genômica enriquecida em microssatélites para pinhão manso forneceu 195 clones contendo sequências repetidas. Foi possível desenhar iniciadores específicos para 115 sequências, sendo que destas uma amostra de 40 iniciadores foi sintetizada. Nove locos apresentaram elevada qualidade nas ampliações de 41 acessos de pinhão manso, revelando 2 a 8 alelos por loco e elevada diversidade. Seis iniciadores amplificaram alelos para as espécies relacionadas *J. podagrica*, *J. pohliana* e *J. gossypifolia*, não tendo sido observada transferibilidade para outras espécies de Euphorbiaceae, tais como: *Hevea brasiliensis*, *Manihot esculenta* e *Ricinus communis*. O desenvolvimento de locos específicos para o pinhão manso viabiliza os estudos de diversidade e determinação do sistema reprodutivo da espécie.

**Palavras-chave:** Biodiesel. Biocombustível. Diversidade genética. Forbol. Pinhão manso.

**Abstract**

Physic nut is a perennial oilseed plant that produces seeds with high oil content. Its commercial importance has increased in recent years by replacing fossil fuels with biofuels, but the lack of commercial varieties and problems with pests and diseases are discouraging cultivation. The development of molecular markers may aid in the search for varieties adapted to the farmers needs. Microsatellites are the most informative class among the genetic markers. This work aimed to develop microsatellite markers from an enriched genomic library for physic nut and to test the transferability of primers for other Euphorbiaceas such as cassava, rubber and castor bean, but also for other species of the genus *Jatropha* (bellyache bush and purging nut). The microsatellite-enriched genomic library for physic nut provided 195 clones containing repeated sequences. It was possible to design specific primers for 115 sequences, from which a sample of 40 primers were synthesized. Nine loci showed high quality amplifications of 41 accessions of physic nut, revealing 2 to 8 alleles per locus and high diversity. Six primers amplified alleles for the related species *J. podagrica*, *J. pohliana* and *J. gossypifolia*, while no transferability was observed for the other Euphorbiaceae species, such as: *Hevea brasiliensis*, *Manihot esculenta* and *Ricinus communis*. The development of specific loci for physic nut allows further studies on diversity and reproductive system for this species.

**Keywords:** Biodiesel. Biofuel. Genetic diversity. Phorbol. Physic nut.

## 5.1 Introdução

O pinhão manso pertence à família Euphorbiaceae que compreende 320 gêneros e cerca de 8000 espécies, distribuídas pelo mundo (WEBSTER, 1994). O gênero *Jatropha* contém cerca de 175 espécies conhecidas (HELLER, 1996). O centro de origem do gênero *Jatropha* ainda é incerto, mas acredita-se que seja originário das Américas e Caribe, e o Brasil aparece como parte do centro diversidade (SOONTORNCHAINAKSAENG; JENJUTTIKUL, 2003). Dentre as principais espécies de *Jatropha* destacam-se: *Jatropha curcas* L. (pinhão manso), *J. elliptica*, *J. gossypifolia*, *J. mollissima*, *J. multifida*, *J. podagrica* e *J. weddeliana* (SUNITA et al., 2005; SUDHEER PAMIDIMARRI et al., 2009). Entretanto, somente *J. curcas* produz sementes com interesse comercial para produção de óleo (30-40%), devido ao hábito indeiscente dos frutos (SATURNINO et al., 2005; BERCHMANS; HIRATA, 2008).

A importância comercial do pinhão manso cresceu nos últimos anos com o programa de substituição dos combustíveis fósseis por biocombustíveis, porém a falta de cultivares comerciais melhoradas geneticamente e os problemas com pragas e doenças estão desestimulando o cultivo em todo o mundo (SATURNINO et al., 2005; KANT; WU, 2011). Dentro deste contexto, os marcadores moleculares podem dar suporte para os estudos de diversidade genética e sistema reprodutivo e, conseqüentemente, desenvolvimento de variedades (FERREIRA; GRATAPAGLIA, 1998).

Os microssatélites se destacam entre todos os marcadores moleculares por apresentar características altamente desejáveis, pois são codominantes, amplamente distribuídos no genoma dos eucariotos, multialélicos, amplificados via PCR e uma vez desenvolvidos os iniciadores, estes podem ser compartilhados entre as instituições de pesquisa (SUGANUMA; CIAMPI, 2009).

Para o desenvolvimento de iniciadores específicos, pode ser empregada a técnica de bibliotecas genômicas (SNUSTAD; SIMMONS, 2001). Entretanto, as mesmas podem resultar em baixa eficiência, pois o número de clones contendo microssatélites pode variar de 0,04% a 12% (ZANE et al., 2002). Contudo, a técnica mais utilizada para isolamento de microssatélites e que resulta em maior eficiência é o método de bibliotecas enriquecidas propostas por Kijas et al. (1994) e Billote et al. (1999). Os métodos de enriquecimento oferecem uma maior eficiência na captura de microssatélites devido à obtenção de grandes quantidades de clones contendo regiões em *tandem* (BILLOTE et al., 1999). Vários grupos de plantas de interesse agrônômico tiveram seus iniciadores de microssatélites desenvolvidos a

partir de bibliotecas genômicas enriquecidas, como eucalipto (BRONDANI et al., 1998), cana-de-açúcar (CORDEIRO et al., 2000), arroz (BRONDANI et al., 2001), palmito (GAIOTTO et al., 2001), banana (CRESTE et al., 2006) e feijão (CARDOSO et al., 2008).

Para o pinhão manso, Sun et al. (2008), Basha et al. (2009), Sudheer Pamadimarri et al. (2009; 2010) e Gomes (2010) desenvolveram marcadores microssatélites para estudar a diversidade genética e estrutura genética dos acessos, porém os locos revelaram pequeno polimorfismo.

Este trabalho teve como objetivos desenvolver marcadores microssatélites a partir de uma biblioteca genômica enriquecida para pinhão manso para estudar a diversidade genética, estrutura genética das populações, sistema de cruzamento e fluxo gênico para subsidiar o desenvolvimento de um programa de melhoramento e conservação da espécie, além de testar o potencial transferibilidade dos iniciadores desenvolvidos para espécies congêneres.

## **5.2 Material e Métodos**

### **5.2.1 Material vegetal**

Quarenta e um acessos de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.), classificados como tóxicos e não tóxicos (Tabela 5.1), de seis populações escolhidas arbitrariamente, no banco de germoplasma do Laboratório de Fisiologia Vegetal e Cultura de Tecidos da Universidade Federal de São Carlos, Araras – SP foram utilizados na validação dos iniciadores. Para o ensaio de transferibilidade dos iniciadores, foram utilizados três genótipos de *J. podagrica* Hook; quatro de *J. pohliana* Müll. Arg.; dois de *J. gossypifolia* L.; quatro de seringueira (*Hevea brasiliensis* [Willd. Ex ADR de Juss.] Muell. Arg.); cinco de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz); e cinco genótipos de mamona (*Ricinus communis* L.).

**Tabela 5.1** - Detalhes das seis populações de pinhão manso utilizados para validação dos iniciadores. Pop. - população

<b>Código</b>	<b>Pop.</b>	<b>Origem</b>	<b>Característica</b>	<b>Código</b>	<b>Pop.</b>	<b>Origem</b>	<b>Característica</b>
<b>JC026</b>	5	Brasil – SP	Tóxico	<b>JC241</b>	38	México	Não tóxico
<b>JC027</b>	5	Brasil – SP	Tóxico	<b>JC242</b>	38	México	Não tóxico
<b>JC028</b>	5	Brasil – SP	Tóxico	<b>JC243</b>	38	México	Não tóxico
<b>JC029</b>	5	Brasil – SP	Tóxico	<b>JC244</b>	38	México	Não tóxico
<b>JC030</b>	5	Brasil – SP	Tóxico	<b>JC245</b>	38	México	Não tóxico
<b>JC031</b>	5	Brasil – SP	Tóxico	<b>JC281</b>	45	Colômbia	Tóxico
<b>JC086</b>	13	Brasil – MG	Tóxico	<b>JC282</b>	45	Colômbia	Tóxico
<b>JC087</b>	13	Brasil – MG	Tóxico	<b>JC283</b>	45	Colômbia	Tóxico
<b>JC088</b>	13	Brasil – MG	Tóxico	<b>JC284</b>	45	Colômbia	Tóxico
<b>JC089</b>	13	Brasil – MG	Tóxico	<b>JC285</b>	45	Colômbia	Tóxico
<b>JC090</b>	13	Brasil – MG	Tóxico	<b>JC286</b>	45	Colômbia	Tóxico
<b>JC231</b>	37	México	Não tóxico	<b>JC287</b>	45	Colômbia	Tóxico
<b>JC232</b>	37	México	Não tóxico	<b>JC288</b>	45	Colômbia	Tóxico
<b>JC233</b>	37	México	Não tóxico	<b>JC289</b>	45	Colômbia	Tóxico
<b>JC234</b>	37	México	Não tóxico	<b>JC290</b>	45	Colômbia	Tóxico
<b>JC235</b>	37	México	Não tóxico	<b>JC341</b>	51	Colômbia	Tóxico
<b>JC236</b>	37	México	Não tóxico	<b>JC342</b>	51	Colômbia	Tóxico
<b>JC237</b>	37	México	Não tóxico	<b>JC343</b>	51	Colômbia	Tóxico
<b>JC238</b>	37	México	Não tóxico	<b>JC344</b>	51	Colômbia	Tóxico
<b>JC239</b>	38	México	Não tóxico	<b>JC345</b>	51	Colômbia	Tóxico
<b>JC240</b>	38	México	Não tóxico				

### 5.2.2 Extração e quantificação do DNA

A extração e quantificação do DNA genômico dos acessos foram descritas com maiores detalhes no Capítulo 3, itens 3.2.3 e 3.2.5.

### 5.2.3 Construção da biblioteca genômica enriquecida

A construção da biblioteca enriquecida foi realizada utilizando as metodologias desenvolvidos por Billote et al. (1999), com algumas modificações conforme. O DNA genômico do acesso 'JC48' (5 µg), originário de Montes Claros de Goiás, GO (população 12), foi digerido com 60 U da enzima de restrição *RsaI* (Fermentas Life Science), 400 mM de espermidina e água Milli-Q para um volume final de 100 µL. O material foi incubado a 37°C *overnight* para a restrição. Para avaliar a qualidade da restrição foram aplicados 10 µL da mesma com 2 µL de tampão de carregamento (*Loading Buffer* - LB) em gel 1,2% agarose em tampão 1X SB, o qual foi corado em brometo de etídeo (1,0 µg.mL<sup>-1</sup>), após eletroforese (2V.cm<sup>-1</sup>) (Figura 5.1).

Os fragmentos digeridos foram ligados aos adaptadores específicos *Rsa21* (5' CTCTTGCTTACGCGTGGACTA 3') e *Rsa25* (5' TAGTCCACGCGTAAGCAAGCAAGAGCACA 3'). A reação foi conduzida com: 1 µg do DNA digerido na etapa anterior, tampão Promega – 7,5 mM Tris-HCl (pH 7,8); 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>; 2,5 mM de DTT e 2,5 mM de ATP, 0,2 µM de cada adaptador, 5 U de T4 DNA *ligase* (Promega) e água Milli-Q para completar 200 µL. A reação foi incubada por duas horas a 20°C.

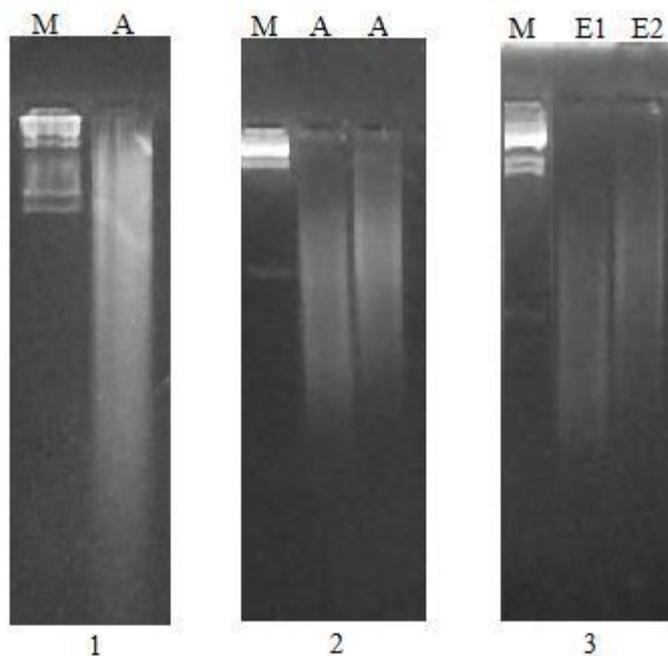
Os fragmentos ligados aos adaptadores foram pré-amplificados utilizando o iniciador *Rsa21*. A reação foi realizada adicionando-se 3 µL do produto da ligação, 0,4 µM do iniciador, 5 µL de 10X *Taq Buffer*; 0,2 mM de dNTP, 3 U de *Taq polymerase* (Fermentas Life Science) num volume final de 50 µL. Para a amplificação foram usados os seguintes ciclos: 95°C por 4 min, seguidos de 20 ciclos de 94°C por 30 s, 60°C por 1 min, 72°C por 1 min e extensão final de 72°C por 8 min. Uma amostra de 10 µL da pré-amplificação foi analisada em 1,2%, gel de agarose em tampão SB 1X, corado em brometo de etídeo (1,0 µg.mL<sup>-1</sup>), após a eletroforese (2 V.cm<sup>-1</sup>) (Figura 5.1).

Para o enriquecimento ocorre a seleção dos fragmentos que contêm regiões microssatélites. Para tanto, os fragmentos são selecionados por hibridização com oligonucleotídeos biotinizados [biotina-(CT)<sub>8</sub> e biotina-(GT)<sub>8</sub>], que foram recuperados com estreptavidinas ligadas a contas magnéticas (KIJAS et al., 1994). As contas magnéticas marcadas com estreptavidina necessitam de uma preparação prévia, desta forma, homogeneizou-se o tubo do produto *Streptavidin Magnesphere Paramagnetic Particle* (Promega Corporation, Madison, WI, EUA). Em seguida, os 600 µL do produto foram magnetizados por 30 s e o sobrenadante foi descartado. Após esse processo, foram realizadas três lavagens com 300 µL de 0,5X Citrato de Sódio Salino (SSC). A cada lavagem descartou-se o sobrenadante, mantendo as esferas magnéticas na parede do tubo com um *rack MagneSphere Technology Magnetic Separation Stand* (Promega Corporation). Ao final do processo as esferas foram ressuspensas em 100 µL de 0,5X SSC.

Para o preparo do DNA, adicionou-se 360 µL de água Milli-Q a 120 µL de DNA da pré-amplificação. Esta solução foi incubada a 95°C por 15 min. Em seguida adicionou-se 13 µL de 20X SSC e 6 µL de oligonucleotídeos biotinizados. Os tubos contendo DNA, 20X SSC e oligonucleotídeos foram incubados a temperatura ambiente por 20 min, com agitação suave a cada 2 min. Os 100 µL de esferas “*beads*” pré-lavadas foram misturadas com 505 µL da solução de hibridização, sendo incubados por 10 min à temperatura ambiente, agitando suavemente a cada 2 min. Após esta etapa, a solução foi magnetizada por 30 s, o sobrenadante foi descartado e as *beads* foram ressuspensas em 300 µL de 0,1X SSC. Esta etapa foi realizada por três vezes (Lavagem 1; Lavagem 2 e Lavagem 3). Na última etapa, a solução foi ressuspensa em 100 µL de água Milli-Q e magnetizada por 30 s. O sobrenadante foi reservado em um tubo 1,5 mL (ELUATO 1) e a solução foi novamente ressuspensa e magnetizada com 150 µL de água Milli-Q (ELUATO 2). Ao final os fragmentos selecionados foram conservados a -20°C.

Procedeu-se a amplificação dos fragmentos selecionados na etapa anterior (ELUATO 1 e ELUATO 2) utilizando o iniciador *Rsa21*. A reação foi feita adicionando-se 10 µL do produto dos fragmentos selecionados (ELUATO 1 e ELUATO 2), 0,4 µM do iniciador, 10 µL de 10X Tampão *Taq*; 100 µM de cada dNTP, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 2 U de *Taq polymerase* (Fermentas Life Science) num volume final de 100 µL. Para a amplificação foram usados os seguintes ciclos: 95°C por 1 min, seguidos de 25 ciclos de 94°C por 40 s, 60°C por 1 min, 72°C por 1 min e extensão final de 72°C por 5 min. Como controle de qualidade da pré-amplificação foram aplicados 10 µL da mesma com 2 µL de tampão de carregamento (LB) em um gel de 1,2% agarose, preparado em tampão 1X SB, o qual foi corado em brometo de

etídeo ( $1,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) após a eletroforese ( $2\text{V.cm}^{-1}$ ). O marcador utilizado foi  $\lambda$  *Hind* III (Figura 5.1).



**Figura 5.1** - Controles realizados durante o desenvolvimento da biblioteca genômica enriquecida em microssatélites para pinhão manso. 1 – Controle da digestão do DNA genômico (M: marcador  $\lambda$  *Hind*III; A: amostra); 2 – Controle da pré amplificação dos fragmentos (M: marcador  $\lambda$  *Hind*III; A: amostra); 3 – Controle da pré-amplificação dos fragmentos selecionados (M: marcador  $\lambda$  *Hind*III; E1: ELUATO 1; E2: ELUATO 2)

### 5.2.3 Clonagem dos fragmentos selecionados

Os fragmentos selecionados no item anterior foram clonados no vetor *pGEM-T Easy* (Promega) utilizando  $5 \mu\text{L}$  do produto da amplificação,  $50 \text{ ng}$  do vetor,  $10 \mu\text{L}$  do Tampão 2X,  $3 \text{ U}$  de T4 DNA *ligase* em volume final de  $20 \mu\text{L}$ . A reação foi incubada *overnight* a  $4^\circ\text{C}$ . A transformação bacteriana foi feita em células eletrocompetentes de *E. coli* (DH10B) e plaqueadas em meio seletivo. As colônias brancas foram isoladas e individualizadas em microplacas (96 poços) contendo meio de parada seletivo com 8% de glicerol por 24 h a  $37^\circ\text{C}$ , sendo posteriormente estocadas a  $-80^\circ\text{C}$ . Nesta etapa foram selecionados 416 clones positivos e quatro clones negativos que foram utilizados como controle.

#### 5.2.4 Isolamento do DNA Plasmidial por Lise Alcalina

O isolamento do DNA plasmidial foi realizado em placa de 96 poços. As etapas deste procedimento incluíram o crescimento bacteriano em meio de cultura líquido *Luria-Bertani* (LB) com a adição de ampicilina ( $100 \text{ mg.L}^{-1}$ ), lise alcalina e purificação de filtragem *Millipore* em placas de 96 poços mediante centrifugação. As colônias transformadas foram inoculadas em placa tipo *deep well* com um único toque do replicador em 1,5 mL de meio de cultura LB, acrescido de ampicilina ( $100 \text{ mg.L}^{-1}$ ), e incubada por cerca de 22 h a  $37^\circ\text{C}$  a 250 rpm. Após o crescimento bacteriano, a microplaca foi centrifugada por 6 min a 4000 rpm. O sobrenadante foi descartado e a microplaca invertida em papel absorvente por 2 min e em seguida acrescentados 240  $\mu\text{L}$  de GET (20% Glicose, 0,5 M EDTA pH 8,0 e 0,5 M Tris HCl pH 7,4) por poço na placa, a qual foi selada, agitada por 2 min para homogeneização das soluções e centrifugada por 9 min a 4000 rpm. O sobrenadante foi descartado, e a microplaca foi invertida em papel absorvente por 2 min. Foram acrescentados mais de 80  $\mu\text{L}$  de GET por poço e em seguida a microplaca foi agitada para homogeneizar as soluções. A suspensão foi transferida para outra microplaca de fundo redondo contendo 2,5  $\mu\text{L}$  de  $10 \text{ mg.mL}^{-1}$  de RNase por poço. A cada poço foram adicionados 60  $\mu\text{L}$  da solução (0,2 N NaOH, 1% Dodecil Sulfato de Sódio [SDS]). Com um adesivo novo, a microplaca foi selada e invertida 30 vezes para homogeneizar as soluções, sendo em seguida incubada por 10 min em temperatura ambiente. Foram adicionados 3 M KOAc por poço, e a placa foi selada e homogeneizada 30 vezes por inversão. A microplaca ficou incubada em temperatura ambiente por 10 min e depois centrifugada até 4000 rpm. Sem adesivo a microplaca foi incubada a  $90^\circ\text{C}$  por 30 min. A microplaca foi selada, resfriada em gelo por 10 min e centrifugada a  $20^\circ\text{C}$  por 6 min a 4000 rpm. Com o auxílio de fitas adesivas, uma placa *Millipore* (MAGV N22) foi fixada no topo de outra placa de fundo “V”. Todo o volume contido na microplaca de fundo redondo foi transferido para a placa *Millipore*. O aparato foi centrifugado a  $20^\circ\text{C}$  a 4000 rpm por 6 min. A placa *Millipore* foi removida e ao filtrado resultante na placa fundo “V” foi acrescentado 100  $\mu\text{L}$  de isopropanol. A placa foi homogeneizada por inversão por 30 vezes. A placa foi centrifugada a  $20^\circ\text{C}$  a 4000 rpm por 45 min. Descartou-se o sobrenadante invertendo a placa, e aos poços foram adicionados 200  $\mu\text{L}$  de etanol 70% gelado. Centrifugou-se a placa a  $20^\circ\text{C}$  a 4000 rpm por 5 min e ao final o sobrenadante foi descartado. Em seguida, a microplaca foi colocada no fluxo laminar por duas horas para secar o DNA. O DNA foi

ressuspensão em 50 µL de água Milli-Q autoclavada, permanecendo *overnight* à temperatura ambiente e em seguida armazenado a -20°C. A concentração do DNA plasmidial foi estimada por fluorimetria e confirmada em gel 1% agarose corado com *SYBRgold*.

### 5.2.5 Seqüenciamento dos clones positivos para microssatélites

As reações de seqüenciamento foram realizadas utilizando o Kit de seqüenciamento *DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing* (GE Healthcare), seguindo as seguintes concentrações para a amplificação dos fragmentos por PCR: 5 µM do iniciador T7, 150 ng de DNA plasmidial, 2 µL de *Sequencing reagent premix* e água Milli-Q para um volume final de 10 µL. As amplificações foram realizadas utilizando um termociclador nas seguintes condições: 30 ciclos 95°C por 40 s, 60°C por 1 min e 72°C por 1 min. Os produtos das amplificações foram purificados adicionando 2 µL de Acetato de Sódio/Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético (EDTA) em cada poço (homogeneizar), seguido da adição de 60 µL de etanol absoluto (homogeneizar), centrifugado 45 min à 4000 rpm à 4°C. O sobrenadante foi então descartado. Foi adicionado 150 µL de etanol 70% e em seguida centrifugado por 15 min a 4000 rpm à 4°C. O sobrenadante foi descartado e os *pellets* foram secos a 40°C por 10 min.

Inicialmente, 192 clones foram seqüenciados na plataforma de sequenciamento automático ABI 3100, no Laboratório de Biotecnologia Animal do Departamento de Zootecnia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo.

### 5.2.6 Construção dos microssatélites

As seqüências foram analisadas quanto à qualidade dos cromatogramas no conjunto de *softwares Phred, Phrap e Consed* (<http://www.phrap.org/index.html>). Foram retiradas das seqüências as regiões correspondentes ao vetor e ao adaptador, restando apenas à seqüência do inserto. Além disso, trechos com má qualidade e seqüências cujas bases não puderam ser identificadas com segurança (*Phred* < 20) também foram excluídos. Com isso, arquivos tipo FASTA foram obtidos para cada clone, contendo as seqüências de interesse e com boa qualidade. Para a identificação das seqüências contendo microssatélites, utilizou-se o programa *WebSat* (MARTINS et al., 2009). As seqüências microssatélites que foram selecionadas para serem desenhados pares de iniciadores continham no mínimo 10, 5, 4, 3, 2 e

2 repetições por motivo microssatélites do tipo mono, di, tri, tetra, penta e hexanucleotídeo, respectivamente.

O desenho dos pares de iniciadores específicos para amplificação dos locos microssatélites foram realizados no programa *on-line Primer3* (ROZEN; SKALETSKY, 2009). Para avaliar a qualidade dos iniciadores *forward*, *reverse* quanto a formação de estruturas secundárias como *Hairpin*, *Dimer*, *Cross Dimer* e *Palindrome*, utilizou-se o programa *NetPrimer* com *Rating* igual ou superior a 90. Para se evitar o desenho de iniciadores redundantes todas as sequências foram alinhadas entre si com o auxílio do programa CLUSTAL W (THOMPSON et al., 1997).

### **5.2.7 Validação dos iniciadores**

Dos 115 pares de iniciadores, foi realizada a síntese química de 40 pares, os quais foram submetidos a um teste de validação. As reações de amplificação dos locos de microssatélites estão descritas com maiores detalhes no Capítulo 3, item 3.2.7.

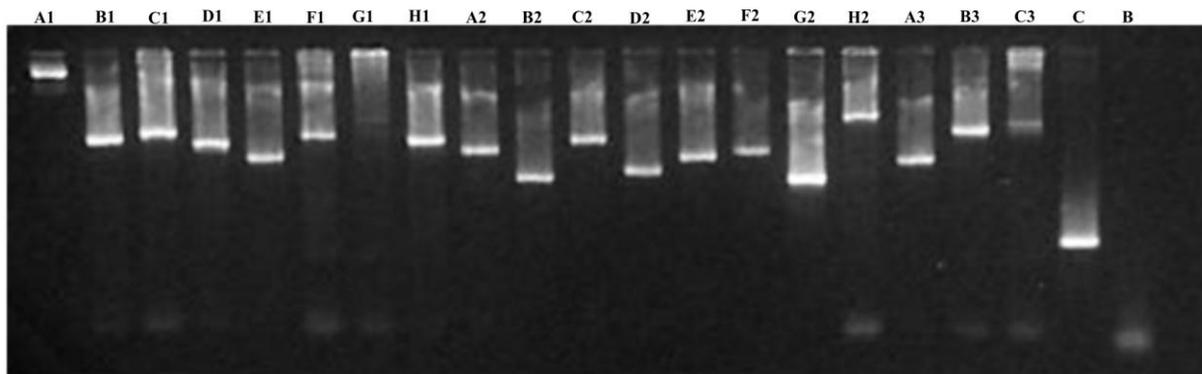
### **5.2.8 Transferibilidade dos iniciadores**

Foi testada a transferibilidade de nove pares de iniciadores desenvolvidos que apresentaram polimorfismo para pinhão manso para outras Euphorbiaceas. As reações de amplificação dos locos microssatélites seguiram os mesmos parâmetros descritos no Capítulo 3, item 3.2.7.

## **5.3 Resultados e Discussão**

### **5.3.1 Biblioteca genômica enriquecida com microssatélites**

A clonagem da biblioteca genômica desenvolvida para pinhão manso apresentou boa eficiência, obtendo-se 416 clones (Figura 5.2). O sequenciamento de 192 clones resultou em 173 clones candidatos a possuírem sequências microssatélites, demonstrando rendimento de 90,1%. Os fragmentos amplificados possuíam em média entre 400 e 600 pb, ou seja, tamanhos ideais para se obter sucesso no sequenciamento.

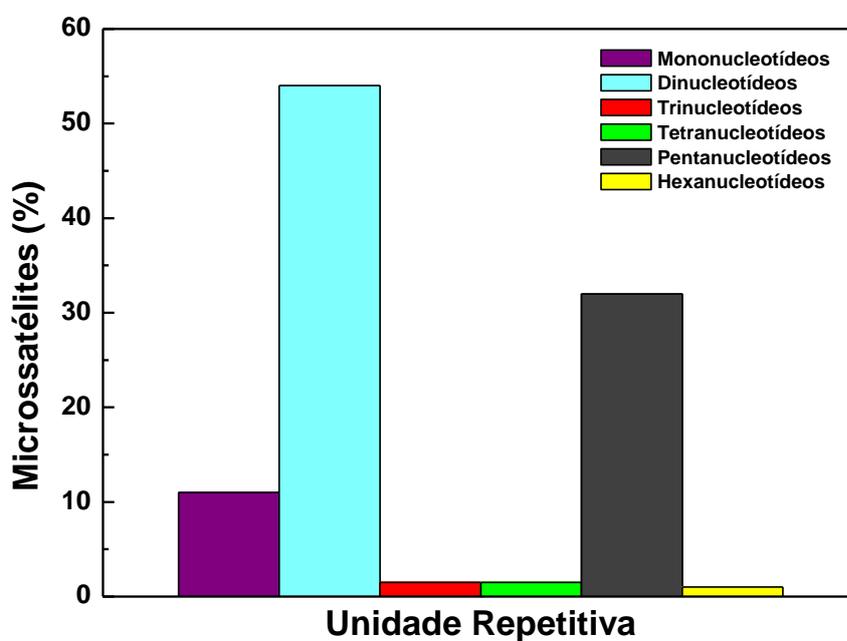


**Figura 5.2** - Visualização da amplificação via PCR de 19 clones da placa 01. Os clones estão numerados, conforme sua disposição na placa (A<sub>1</sub> a C<sub>3</sub>), N: colônia não transformada (controle negativo); B: branco

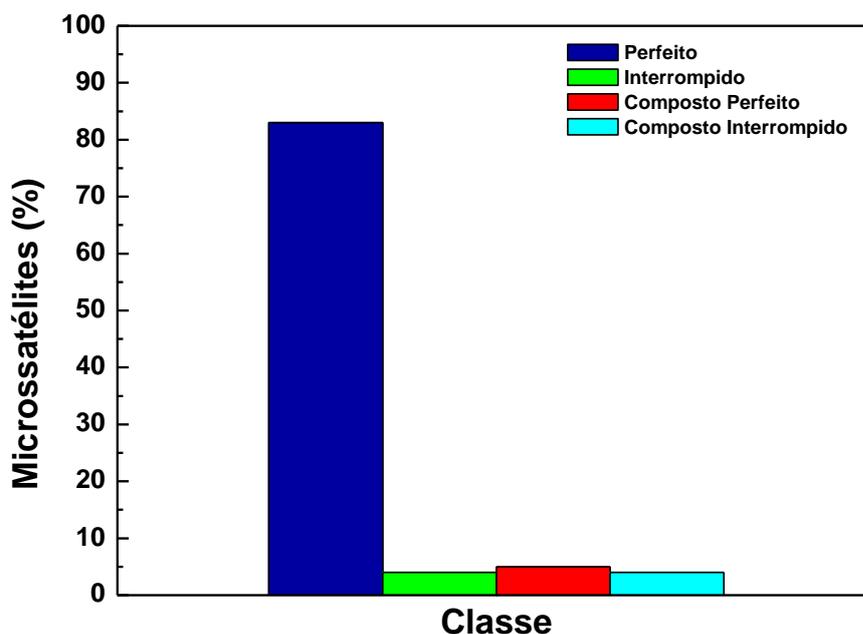
Todas as 173 sequências foram analisadas quanto à qualidade dos cromatogramas no conjunto de *softwares Phred, Phrap e Consed* (<http://www.phrap.org/index.html>), sendo selecionados trechos que apresentavam o parâmetro *Phred* > 20. Detectou-se que 104 das 173 sequências continham 195 microssatélites no total, representando um enriquecimento da biblioteca de 60,1%. Contudo, as percentagens de enriquecimento podem ser influenciadas pelo critério utilizado para se estabelecer o tamanho mínimo do motivo a ser classificado como microssatélite, ou mesmo, pelas etapas de desenvolvimento da mesma. Todas as sequências que apresentaram motivos microssatélites foram alinhadas entre si e 28 delas (26,9%) apresentaram redundância, sendo as complementares excluídas. Neste trabalho, sequências com mais de 90% de identidade foram consideradas redundantes, seguindo o mesmo parâmetro utilizado por Oliveira (2006) em biblioteca de maracujá-amarelo. A redundância pode ser atribuída à presença de clones duplicados pelo próprio procedimento da PCR durante as etapas de enriquecimento (OLIVEIRA, 2006). Quanto à classe de repetição das sequências, os dinucleotídeos foram os mais frequentes (53,7%), seguidos pela classe penta (31,6%), mono (11%), tri (1,5%), tetra (1,5%), e hexanucleotídica (0,7%) (Figura 5.3).

Os microssatélites também podem ser classificados como perfeitos (quando a sequência repetida não é interrompida por qualquer base que não pertença ao motivo), interrompidos (quando existe mais de um par de bases que não correspondem ao microssatélite), compostos perfeitos (quando uma sequência contém duas sequências repetidas adjacentes), compostos interrompidos (quando uma sequência contém duas sequências repetidas adjacentes e os microssatélites estão interrompidos) e imperfeitos (quando existe entre os motivos um par de bases que não corresponde ao microssatélite) (WEBER, 1990). Os microssatélites perfeitos apresentam-se mais frequentes (82,8%), quando

comparados com sequências que possuem interrupções dentro dos motivos (Figura 5.4). Resultados similares foram observados por Gimenez et al. (2007) em *Arachis hypogaea* (63,1%) e Penha (2007) em *Passiflora alata* (88,6%).



**Figura 5.3** - Porcentagem de microssatélites encontrados em relação à unidade repetitiva



**Figura 5.4** - Porcentagem de microsatélites encontrados em relação a classe

Ao se utilizar a técnica de enriquecimento da biblioteca genômica, espera-se obter microsatélites complementares às sondas utilizadas, contudo é comum encontrar a presença de outros tipos de microsatélites (SHI et al., 2007). Para o desenvolvimento da biblioteca para o pinhão manso utilizaram-se as sondas GT e CT esperando-se assim, motivos dos tipos CA e GA e repetições do tipo dinucleotídicas. Contudo, foram observados motivos microsatélites com os mais variados tipos de repetições, porém o motivo GA foi o mais freqüente (13,2%). Isto pode ser explicado pela baixa estrigência adotada nos procedimentos de hibridização, permitindo assim que as sondas se hibridizassem sem a perfeita complementaridade com as sequências alvos (ASKENAZI et al., 2001). O motivo GA também foi o mais abundante durante a construção de uma biblioteca genômica enriquecida para *Hevea brasiliensis* (FENG et al., 2009). Os motivos AG são mais freqüentes nos genomas das plantas do que os motivos AC (POWELL et al., 1996). Contudo, em *Acacia mangium* os motivos AC apareceram com maior freqüência (BUTCHER et al., 2000). No caso do pinhão manso os dados indicam que existe maior freqüência dos motivos GA, seguido por GT (8%).

Dos 195 microsatélites identificados, foi possível desenhar 115 (59,0%) iniciadores específicos para pinhão manso. A ocorrência de sequências de baixa qualidade, ou mesmo a posição dos motivos microsatélites próxima ao sítio de clonagem não permitiram o desenho

de iniciadores para as 80 sequências restantes. Para 36 sequências (38,7%), foram encontrados dois ou mais motivos microssatélites. Nestes casos, desenharam-se iniciadores para a amplificação de ambos os locos.

### 5.3.2 Validação dos iniciadores

Foram desenhados 115 pares de iniciadores a partir do desenvolvimento da técnica de biblioteca genômica enriquecida para microssatélites de pinhão manso (Anexo B), porém 40 foram sintetizados e submetidos a testes de validação (Anexo C).

Dos 40 locos desenvolvidos para o estudo, nove (22,5%) apresentaram perfis polimórficos: *mJCENA27*, *mJCENA41*, *mJCENA47*, *mJCENA63*, *mJCENA87*, *mJCENA106*, *mJCENA108*, *mJCENA110* e *mJCENA111* (Tabela 5.2; Anexo D). Para os outros 28 locos (70%), verificou-se a amplificação de uma única banda (monomórfico) e três locos (7,5%) não amplificaram nenhum fragmento.

A partir dos nove locos que foram usados na amplificação dos 41 genótipos de pinhão manso, detectaram-se 45 alelos. O número de alelos variou de dois a oito por loco, sendo em média detectados cinco alelos. O loco que apresentou maior número de alelos foi o *mJCENA41* (oito alelos), e o menor número foi encontrado no loco *mJCENA106* (dois alelos) (Tabela 5.3). O número médio de alelos foi maior do que encontrado por Basha et al. (2009) para pinhão manso, que observou somente dois alelos, por Sudheer Pamidimarri et al. (2010), 3,51 alelos, Wen et al. (2010) utilizando EST-SSR a partir de mandioca encontraram em pinhão manso, 3,51, e Yaowalak et al. (2011), somente 1,4 alelos.

**Tabela 5.2** – Características dos nove iniciadores microssatélites desenvolvidos para pinhão manso, contendo as sequências forward (F) e reverse (R) dos iniciadores, as repetições, tamanho em pares de base, as temperaturas de anelamento ( $T_a$ ) e identificação no *GenBank*

<i>Locos</i>	<b>Iniciadores</b>	<b>Repetições</b>	<b>Tamanho (pb)</b>	<b><math>T_a</math> (°C)</b>	<b><i>GenBank</i></b>
<i>mJCENA27</i>	F: CATTTCATCAAGGCCTAC R: GTATTCTCCACACGCAACT	(GA) <sub>12</sub>	157	54 55	GF111554
<i>mJCENA41</i>	F: CTTTCTTACCCCTCATCCTT R: AAAGCCAGGACATACTTGAA	(AC) <sub>18</sub>	170	55 55	GF111555
<i>mJCENA47</i>	F: GCCCGAGTTCTCTATAAGGT R: CCAAGAGAAATTAGGAATGC	(GT) <sub>7</sub> (GA) <sub>12</sub>	235	55 54	GF111556
<i>mJCENA63</i>	F: GCGTGGACTATCTCAACTTC R: CTGATTACGCAATGGA ACTA	(GA) <sub>17</sub>	230	55 54	GF111557
<i>mJCENA87</i>	F: ATCTGGAGTGAAACCAAAGA R: CACATGGTAAGCATTACAAGC	(GT) <sub>15</sub> (GA) <sub>8</sub>	214	55 56	GF111558
<i>mJCENA106</i>	F: AAGGACGCAGAAAGAGAAGTTG R: TTTCGGAGGAGATGAAGAAGAC	(AGA) <sub>8</sub>	251	60 59	GF111559
<i>mJCENA108</i>	F: GTGTGGTGCTTACCCCTATTTT R: GCCTCCTTTTCTTTTCCTGTTT	(GAA) <sub>10</sub>	270	59 60	GF111560
<i>mJCENA110</i>	F: GCGTAGAAACACAGGAACATCA R: ACTCTCAATGGTTGTTATGGGC	(GT) <sub>14</sub>	353	60 60	GF111561
<i>mJCENA111</i>	F: AAGCCCAGTTGCTCATATTCAG R: CAAGGCTCAAAGATAGAAGGGA	(AT) <sub>6</sub> (GT) <sub>6</sub>	337	60 59	GF111562

A heterozigosidade média observada foi  $H_o=0,53$ , a esperada  $H_e=0,66$  e o índice de fixação médio foi  $f=0,20$ , os quais foram significativamente diferentes de zero para seis locos (*mJCENA27*, *mJCENA41*, *mJCENA47*, *mJCENA63*, *mJCENA87* e *mJCENA111*). Para os locos *mJCENA108* e *mJCENA110*, o índice de fixação foi negativo, demonstrando um excesso de heterozigotos nestes locos. Yaowalak et al. (2011) avaliando acessos tóxicos (Tailândia, Miamar, Camboja, Índia, Laos e China) e não tóxicos (México) de pinhão manso encontraram valores médios de  $H_o=0,28$  e para  $H_e=0,16$ . Tanya et al. (2010), estudando acessos do México, China, Tailândia e Vietnã utilizando marcadores ISSR encontraram uma heterozigosidade total de 0,355. Os resultados também indicam que os locos microssatélites desenvolvidos foram eficientes na detecção da diversidade genética viabilizando estudos de diversidade, sistema reprodutivo e melhoramento da espécie.

**Tabela 5.3** - Avaliação inicial em seis populações de *J. curcas* do Brasil, México e Colômbia, onde *n* é o número de acessos analisados, *A* é o número de alelos;  $H_o$  heterozigosidade observada;  $H_e$  heterozigosidade esperada; *f* índice de fixação

<i>Locos</i>	<i>n</i>	<i>A</i>	$H_o$	$H_e$	<i>F</i>
<i>mJCENA27</i>	39	5	0,41	0,75	0,45*
<i>mJCENA41</i>	41	8	0,59	0,86	0,32*
<i>mJCENA47</i>	40	6	0,43	0,73	0,42*
<i>mJCENA63</i>	40	4	0,38	0,61	0,39
<i>mJCENA87</i>	41	7	0,66	0,82	0,20
<i>mJCENA106</i>	41	2	0,24	0,25	0,04
<i>mJCENA108</i>	41	6	0,90	0,77	-0,18
<i>mJCENA110</i>	41	3	0,68	0,58	-0,19
<i>mJCENA111</i>	41	4	0,46	0,55	0,16
<b>Média</b>	-	<b>5</b>	<b>0,53</b>	<b>0,66</b>	<b>0,20*</b>

\*  $P<0.05$  Correção de Bonferroni

### 5.2.3 Transferibilidade dos iniciadores

O desenvolvimento dos marcadores microssatélites exige um alto investimento financeiro e conhecimento técnico. A transferibilidade ou amplificação heteróloga é uma alternativa para minimizar os custos com o desenvolvimento dos marcadores microssatélites, pois aproveita a natureza conservada da sequência de nucleotídeos das regiões flanqueadoras de espécies aparentadas e assim utilizam-se pares de iniciadores desenvolvidos para outros estudos genéticos (COLEVATI et al., 1999; ZUCCHI et al., 2002).

A transferibilidade de iniciadores microssatélites tem sido utilizada com sucesso para espécies do mesmo gênero, ou seja, o sucesso da amplificação heteróloga está relacionado com a proximidade filogenética das espécies. Moretzsohn et al. (2004) analisaram 36 espécies de *Arachis* e observaram a transferibilidade de 76% dos iniciadores microssatélites desenvolvidos para *Arachis hypogaea*.

Em frutíferas também existem relatos de altas taxas de transferibilidade entre espécies próximas. Zucchi et al. (2002) testaram a transferibilidade de iniciadores microssatélites desenvolvidos para *Eucalyptus* spp. para *Eugenia dysenteria* e somente 2,8% foram transferidos. Santos et al. (2007) avaliaram os mesmos iniciadores testados por Zucchi et al. (2002) e verificaram a transferibilidade de 180 iniciadores de 404 para *Acca sellowiana*, sendo que todas as espécies pertencem a família Myrtaceae, observando assim uma taxa de transferibilidade de 44,5%. Destes, 38 locos apresentavam-se como polimórficos (21,1%).

Taxas de 60,4% de transferibilidade foram observados por Alves et al. (2006) utilizando iniciadores microssatélites de cacau (*Theobroma cacao*) para cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*). Para o gênero *Dioscorea*, taxas variando de 33 a 100% foram observadas para a transferibilidade de nove locos SSR de *D. alata* para as espécies *D. trifida*, *D. bulbifera* e *D. cayenensis-D. rotundata* (SIQUEIRA et al., 2011).

Para a família Euphorbiaceae, Roa et al. (2000) confirmaram a transferibilidade entre *Manihot esculenta* Crantz e outras seis espécies do gênero e verificaram que quanto maior a distância filogenética entre as espécies, menor era a taxa de transferibilidade. Wen et al. (2010) utilizando EST-SSR e SSR desenvolvidos para mandioca conseguiram uma taxa de transferibilidade de 8,6% e 1% respectivamente.

Aqui a taxa de transferibilidade variou de 55,5% a 66,7% para as espécies do gênero *Jatropha* (Tabela 5.4), indicando que as sequências flanqueadoras são conservadas para essas espécies, porém para as outras Euphorbiaceas, tais como, mandioca, seringueira e mamona, não foram observadas amplificações. Para as Euphorbiaceas estudadas confirmou-se os

resultados encontrados por Roa et al. (2000), onde as espécies pertencentes ao gênero *Jatropha* apresentaram maior taxa de transferibilidade quando comparadas com as outras Euphorbiaceas. Tais resultados comprovam a relação direta entre o sucesso na transferibilidade dos iniciadores microssatélites e a proximidade filogenética, porém outros pressupostos devem ser levados em consideração como a taxa de mutação associada à região flanqueadora de cada loco e a qualidade das sequências e condições de amplificação. Nossos resultados confirmam que o declínio do sucesso da amplificação está relacionado ao aumento da distância genética (WHITE; POWELL, 1997; WITSENBOER et al., 1997).



## 5.4 Conclusão

Os novos locos desenvolvidos são eficientes para detecção da diversidade genética em pinhão manso e para espécies próximas filogeneticamente.

## Referências

- ALVES, R. M.; SEBBENN, A. M.; ARTERO, A. S.; FIGUEIRA, A. Microsatellite loci transferability from *Theobroma cacao* to *Theobroma grandiflorum*. **Molecular Ecology Notes**, Malden, v. 6, p. 1219-1221, 2006.
- ASKENAZI, V.; CHANI, E.; LAVI, U.; LEVY, D.; HILLEL, J.; VEILLEUX, R. E. Development of microsatellite markers in potatoes and their use in phylogenetics and fingerprint analyses. **Genome**, Ottawa, v. 44, p. 50-62, 2001.
- BASHA, S. D.; GEORGE, F.; MAKKAR, H. P. S.; BECHER, K.; SUJATHA, M. A comparative study of biochemical traits and molecular markers for assessment of genetic relationships between *Jatropha curcas* L. germplasm from different countries. **Plant Science**, Amsterdam, v. 176, p. 812-823, 2009.
- BERCHMANS, H. J.; HIRATA, S. Biodiesel production from crude *Jatropha curcas* L. seed oil with a high content of free fatty acids. **Bioresource Technology**, Essex, v. 99, p. 1716-1721, 2008. doi: 10.1016/j.biortech. 2007.03.051
- BILLOTTE, N.; LAGODA, P. J. L.; RISTERUCCI, A. M.; BAURENS, F. C. Microsatellite – enriched libraries: applied methodology for the development of SSRs markers in tropical crops. **Fruits**, Paris, v. 54, n. 4, p. 277-288, 1999.
- BRONDANI, R. P. V.; BRONDANI, C.; TARCHINI, R.; GRATTAPAGLIA, D. Development, characterization and mapping of microsatellite markers in *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla*. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 97, n. 5-6, p. 816-827, 1998.
- BRONDANI, C. B.; RANGEL, P. H.; FERREIRA, M. E. Development and mapping of *Oryza glumaepatula* – derived microsatellite markers in the interspecific cross *Oryza glumaepatula* x *O. sativa*. **Hereditas**, Lund, v. 134, n. 1, p. 59-71, 2001.
- BUTCHER, P. A.; MORAN, G. F. Genetic linkage mapping in *Acacia mangium*. Development of an integrated map from two outbreed pedigrees using RFLP and microsatellite loci. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 101, p. 1282-1290, 2000.
- CARDOSO, J. M. K.; OBLESSUC, P. R.; CAMPOS, T.; SFORÇA, D. A.; CARBONELL, S. A. M.; CHIORATTO, A. F.; FORMIGHIERI, E. F.; SOUZA, A. P.; BENCHIMOL, L. L. New microsatellite markers developed from an enriched microsatellite common bean library. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 43, n. 7, p. 929-936, 2008.

CORDEIRO, G. M.; TAYLOR, G. O.; HENRY, R. J. Characterization of microsatellite markers from sugarcane (*Saccharum* sp.) a highly polyploidy species. **Plant Science**, Amsterdam, v. 155, p. 161-168, 2000.

COLLEVATTI, R. G.; BRONDANI, R. V.; GRATTAPAGLIA, D. Development and characterization of microsatellite markers for genetic analysis of a Brazilian endangered tree species *Caryocar brasiliense*. **Heredity**, London, v. 83, n. 6, p. 748-756, 1999.

CRESTE, S.; BENATTI, T. R.; ORSI, M. R.; RISTERUCCI, A. M.; FIGUEIRA, A. Isolation and characterization of microsatellite loci from a commercial cultivar of *Musa acuminata*. **Molecular Ecology Notes**, Malden, v. 6, n. 2, p. 303-306, 2006.

FENG, S. P.; LI, W. G.; HUANG, H. S.; WANG, J. Y.; WU, Y. T. Development, characterization and cross-species/genera transferability of EST-SSR markers for rubber tree. **Molecular Breeding**, Heidelberg, v. 23, n. 1, p. 85-97, 2009.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética**. 3. ed. Brasília, DF: Embrapa-Cenargen, 1998. 220 p.

GAIOTTO, F. A.; BRONDANI, R. P.V.; GRATTAPAGLIA, D. Microsatellite markers for heart of palm – *Euterpe edulis* and *E. oleraceae* Mart. (Arecaceae). **Molecular Ecology Notes**, Malden, v. 1, p. 86-88, 2001.

GIMENEZ, M. A.; HOSHINO, A. A.; BARBOSA, A. V. G.; PALMIERI, D. A.; LOPES, C. R. Characterization and transferability of microsatellite markers of the cultivated peanut (*Arachis hypogaea*). **BMC Plant Biology**, London, v. 7, p. 9, 2007. doi: 10.1186/1471-2229-7-9.

GOMES, K. A.; ALMEIDA, T. C.; GESTEIRA, A. S.; LÔBO, I. P.; GUIMARÃES, A. C. R.; MIRANDA, A. B.; SLUYS, M. A. V.; CRUZ, R. S.; CASCARDO, J. C. M.; CARELS, N. ESTs from seedsto assist the selective breeding of *Jatropha curcas* L. for oil and active compounds. **Genomics Insights**, London, v. 3, p. 29-56, 2010.

HELLER, J. **Physic nut, *Jatropha curcas* L.:** promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. Rome; International Plant Genetic Resource Institute, 1996. 66 p.

KANT, P.; WU, S. The extraordinary collapse of *Jatropha* as a Global Biofuel. **Environmental Science & Technology**, Easton, v. 45, n. 17, p. 7114-7115, 2011. doi: 10.1021/es201943v.

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

MARTINS, W. A.; LUCAS, D. C. S.; NEVES, K. F. S.; BERTIOLI, D. J. WebSat - A web software for microsatellite marker development. **Bioinformatics**, Bethesda, v. 6, n. 3, p. 282-283, 2009.

MORETZSOHN, M. C.; HOPKINS, M. S.; MITCHELL, S. E.; KRESOVICH, S.; VALLS, J. F. M.; FERREIRA, M. M. E. Genetic diversity of peanut (*Arachis hypogaea* L.) and its wild relatives based on the analysis of hypervariable regions of the genome. **BMC Plant Biology**, London, v. 4, p. 11, 2004. doi: 10.1186/1471-2229-4-11

OLIVEIRA, E. J. **Desenvolvimento e uso de marcadores microssatélites para construção e integração de mapas genéticos de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.)**. 2006. 152 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

PENHA, H. A. **Desenvolvimento de marcadores moleculares em *Passiflora alata* Curtis**. 2007. 92 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

POWELL, W.; MACHRAY, G. C.; PROVAN, J. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 1, p. 209-245, 1996.

ROA, A. C.; CHAVARRIAGA-AGUIRRE, P.; DUQUE, M. C.; MAYA, M. M.; BONIERBALE, M. W.; IGLESIAS, C.; TOHME, J. Cross-species amplification of cassava (*Manihot esculenta*) (*Euphorbiaceae*) microsatellites: Allelic polymorphism and degree of relationship. **American Journal of Botany**, New York, v. 87, p. 1647-1655, 2000.

ROZEN, S.; SKALETSKY, H. J. **PRIMER3**. Disponível em: <[http://www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3\\_www.cgi](http://www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi)>. Acesso em: 26 set. 2009.

SANTOS, K. L.; LEOCIR, J. W.; DANTAS, A. C. M.; GUERRA, M. P.; DUCROQUET, J. P. H. J.; NODARI, R. O. N. Transference of microsatellite markers from *Eucalyptus* spp. to *Acca sellowiana* and the successful use of this technique in genetic characterization. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 30, p. 73-79, 2007.

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

SHI, Y.; YANG, G.; LIU, Y.; LIAO, M.; LI, X.; CONG, Y. Development of 18 polymorphic microsatellite DNA markers of *Laminaria japonica* (Phaeophyceae). **Molecular Ecology Notes**, Malden, v. 7, n. 4, p. 620-622, 2007.

SIQUEIRA, M. V. B. M.; MARCONI, T. G.; BONATELLI, M. L.; ZUCCHI, M. I.; VEASEY, E. A. New microsatellite loci for water yam (*Dioscorea alata* – Dioscoreaceae) and cross-amplification for other *Dioscorea* species. **American Journal of Botany**, New York, v. 98, n. 6, p. e144-e146, 2011.

SNUSTAD, D. P.; SIMMONS, M. J. **Fundamentos de genética**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 755 p.

SOONTORNCHAINAKSAENG, P.; JENJITTIKUL, T. Karyology of *Jatropha* (Euphorbiaceae) in Thailand. **Thai Forest Bulletin**, Bangkok, v. 31, p. 105-112, 2003.

SUDHEER PAMIDIMARRI, D. V.; 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.

SUDHEER PAMIDIMARRI, D. V. N.; MASTAN, S. G.; RAHMAN, H.; RAVI PRAKASH, C.; SINGH, S.; REDDY, M. P. Cross species amplification ability of novel microsatellites isolated from *Jatropha curcas* and genetic relationship with sister taxa. **Molecular Biology Reports**, Dordrecht, v. 38, p. 1383-1388, 2010.

SUGANUMA, E.; CIAMPI, A. Y. Análise genética populacional de Jatobá (*Hymenaea* spp Leguminosae) utilizando microssatélites. In: ENCONTRO LATINO-AMERICANO DE BIOTECNOLOGIA VEGETAL: REDBIO, 4., 2001, Goiânia. **Resumos...** Montevideo, Argentina: REDBIO, 2001. p. 148. Disponível em: <[http://www.redbio.org/portal/encuentros/enc\\_2001/posters;03-007.pdf](http://www.redbio.org/portal/encuentros/enc_2001/posters;03-007.pdf)>. Acesso em: 27 out. 2009.

SUN, Q. B.; LI, L. F.; WU, G. J.; GE, X.- J. SSR and AFLP markers reveal low genetic diversity in the biofuel plant *Jatropha curcas* in China. **Crop Science**, Madison, v. 48, p. 1865-1870, 2008.

SUNITA, K.; KOCHHAR, V. K.; SINGH, S. P.; KATIYAR, R. S.; PUSHANGADAN, P. Differential rooting and sprouting behavior of two *Jatropha* species and associated physiological and biochemical changes. **Current Science**, Bangalore, v. 89, n. 6, p. 936-938, 2005.

TANYA, P.; TAEPRAYOON, P.; HADKAM, Y.; SRINIVES, P. Genetic diversity among *Jatropha* and *Jatropha*-related species based on ISSR markers. **Plant Molecular Biology Reporter**, Heidelberg, v. 29, p. 252-264, 2010.

WEBER, J. L. Informativeness of human (dC-dA)<sub>n</sub> (dG-dT)<sub>n</sub> polymorphisms. **Genomics**, Orlando, v. 7, p. 524-530, 1990.

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

WEN, M.; WANG, H.; XIA, Z.; ZOU, M.; LU, C.; WANG, W. Development of EST-SSR and genomic-SSR markers to assess genetic diversity in *Jatropha curcas* L. **BMC Research Notes**, London, v. 3, p. 1-8, 2010.

WHITE, G.; POWELL, W. Cross-species amplification of SRR loci in the *Meliaceae* family. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 6, p. 1195-1197, 1997.

WITSENBOER, H.; MICHELMORE, R. W.; VOGEL, J. Identification, genetic localization, and allelic diversity of selectively amplified microsatellite polymorphic loci in lettuce and wild relatives (*Lactuca* spp.). **Genome**, Ottawa, v. 40, p. 923-936, 1997.

YAOWALAK, N.; ARUNEE, W.; THITAPORN, P.; NONGLUCK, K.; RUNGSARID, K.; TANEE, R.; CHALERMPOL, P. Genetic diversity of physic nut (*Jatropha curcas* L.) revealed by SSR markers. **Journal Crop Science Biotechnology**, Heidelberg, v. 14, p. 105-110, 2011.

ZANE, L.; BARGELLONI, L.; PATARNELLO, T. Strategy for microsatellite isolation: a review. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 11, p. 1-16, 2002.

ZUCCHI, M. I.; BRONDANI, R. V.; PINHEIRO, J. B.; BRONDANI, C.; VENCOVSKY, R. Transferability of microsatellite markers from *Eucalyptus* spp. to *Eugenia dysenterica* (Myrtaceae family). **Molecular Ecology Notes**, Malden, v. 2, p. 512-514, 2002.

## 6. CARACTERIZAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE *Jatropha curcas* L., REVELADOS POR MARCADORES MICROSSATÉLITES

### Resumo

A diversidade e a estrutura genética foram estudadas em populações de pinhão manso do Brasil, bem como de alguns países da América, Ásia e África, utilizando-se oito locos microssatélites. Foram utilizados 345 acessos distribuídos em 51 populações de acordo com sua origem. A partir das frequências alélicas foram avaliados parâmetros de diversidade como número de alelos por loco (1,55), porcentagem de locos polimórficos (51%), heterozigosidade observada ( $H_o = 0,43$ ) e heterozigosidade esperada ( $H_e = 0,25$ ). O número de alelos por loco foi superior aos outros trabalhos que empregaram SSR para a espécie. Na análise da estrutura genética, verificou-se que a maior parte da diversidade genética encontra-se distribuída entre populações ( $G_{ST} = 0,62$ ), embora uma parcela considerável da diversidade genética seja atribuída à diversidade dentro de populações ( $H_s = 0,25$ ). A estrutura genética das populações foi também avaliada em diferentes níveis hierárquicos: I) entre e dentro das populações em geral; II) entre regiões, considerando duas regiões (América versus demais países), entre populações dentro de regiões e dentro de populações; III) entre e dentro populações, considerando somente as populações originárias do Brasil. Os resultados demonstraram que a maior parte da variação genética foi encontrada entre as populações (58%). Quando foram comparadas duas regiões verifica-se que a maior parte da variabilidade concentra-se entre populações dentro de regiões (53%). Para as populações brasileiras, a maior parte da diversidade encontra-se entre as mesmas (54%). As análises de coordenadas principais revelam a existência de variabilidade genética significativa entre as populações brasileiras, colombianas e mexicanas, e a proximidade das populações cultivadas na África e Ásia a esses três grupos. O estudo fornece uma visão abrangente da diversidade genética das populações estudadas. Os resultados demonstram que a diversidade encontra-se estruturada principalmente entre as populações, indicando assim que os programas de conservação e melhoramento genético da espécie devem buscar utilizar materiais genéticos de diferentes origens.

**Palavras-chave:** Biocombustível. Estrutura genética. Melhoramento genético. Pinhão manso.

## Abstract

The diversity and genetic structure have been studied in *Jatropha curcas* populations from Brazil, and from some American, Asian and African countries, using eight microsatellite loci. We used 345 accessions distributed in 51 populations according to their origin. From the allelic frequencies, the following genetic diversity parameters were evaluated, such as number of alleles per locus (1.55), percentage of polymorphic loci (51%), observed heterozygosity ( $H_o = 0.43$ ) and expected heterozygosity ( $H_e = 0.25$ ). The number of alleles per locus was higher than other studies which employed SSR for the species. In the analysis of genetic structure, we found that most genetic diversity is distributed among populations ( $G_{ST'} = 0.62$ ), although a considerable amount of genetic diversity is attributed to the diversity within populations ( $H_s = 0.25$ ). The genetic structure of populations was also assessed in the different hierarchical levels: I) between and within populations, in general; II) between regions, considering two regions (America versus other countries), among populations within regions and within populations; III) between and within populations, considering only the Brazilian populations. The results showed that most of the genetic variation was found among populations (58%). When two regions were compared it was verified that most of the variability is concentrated among populations within regions (53%). For the Brazilian populations, most of the diversity is found among them (54%). The principal coordinate analysis revealed the existence of significant genetic variability among populations in Brazil, Colombia and Mexico, and the proximity of populations from Africa and Asia to these three groups. The study provides a comprehensive overview of the genetic diversity of populations studied. Results show that diversity in physic nut is structured primarily among populations, indicating that the programs for conservation and breeding of the species should seek to use genetic material from different sources.

**Keywords:** Biofuel. Genetic structure. Plant breeding. Physic nut.

## 6.1 Introdução

O pinhão manso é uma espécie arbórea perene oleaginosa, supostamente nativa das Américas, porém, na atualidade, é cultivada em quase todas as regiões intertropicais do mundo, estendendo sua ocorrência pelos continentes asiático, africano e Oceania (ARRUDA et al., 2004; YAOWALAK et al., 2011). No Brasil, é encontrado em todas as regiões, devido à sua rusticidade e fácil adaptação a diferentes condições edafoclimáticas (SATURNINO et al., 2005; ROSADO et al., 2010). A capacidade do pinhão manso se desenvolver em solos marginais faz com que este tenha vantagens sobre outras culturas oleaginosas, principalmente no que se refere à produção de biocombustível (SATURNINO et al., 2005).

O pinhão manso é uma planta monóica, supostamente alógama, sujeita a geitonogamia, com um genoma de 416 Mb, distribuídos em 11 pares de cromossomos (LIU et al., 2008; ABDELGADIR et al., 2009). O sistema de reprodução aliado a sua ampla distribuição geográfica sugere um elevado grau de variação genética nas populações, o que seria promissor para o desenvolvimento de um programa de melhoramento genético (GINWAL et al., 2004; LUO et al., 2007; ROSADO et al., 2010).

A espécie sempre despertou o interesse, porém nos últimos anos, a crescente demanda de substitutos para os combustíveis fósseis valorizou o pinhão manso, devido à qualidade do óleo que produz, onde se destaca a não emissão de fumaça, ausência de cheiro e grande poder de combustão (SATURNINO et al., 2005).

O plantio do pinhão manso passou por um período de euforia, porém não existe cultivares melhoradas disponíveis para o plantio, e problemas com pragas e doenças desestimularam o cultivo em todo o mundo (KANT; WU, 2011). Estima-se que mais de três milhões de hectares de pinhão manso já foram implantados no mundo, destacando-se países como a China, Índia e o Brasil como maiores produtores (FAIRLESS, 2007). Segundo Rosado et al. (2010), no Brasil foram plantados cerca de 40.000 ha e a tendência é a ampliação da área de cultivo.

Contudo, informações como área de ocorrência natural da espécie, estrutura genética de populações são ainda incipientes (SUDHEER PAMIDIMARRI et al., 2009). Desta forma, existe a necessidade de estudos dirigidos, a fim de escolher corretamente estratégias de manejo, melhoramento e conservação de recursos genéticos para a cultura em larga escala do pinhão manso. Os estudos genéticos são indispensáveis para a exploração racional do potencial produtivo do pinhão manso como cultura oleaginosa.

Em 2005, foi implantado um banco de germoplasma de pinhão manso na Universidade Federal de São Carlos, Araras, SP, abrigando acessos brasileiros e de outros países. Contudo, não são conhecidas as relações genéticas entre os acessos, sendo assim, a caracterização genética e morfológica entre eles se torna essencial para o sucesso do programa de melhoramento genético, a partir de material conservado. Neste contexto, o a utilização dos marcadores microssatélites, é de fundamental importância para os estudos genéticos da espécie.

O objetivo deste trabalho foi utilizar locos microssatélites para avaliar a diversidade e estrutura genética de populações de pinhão manso originárias de diversas regiões do Brasil e do mundo.

## **6.2 Material e Métodos**

### **6.2.1 Material Vegetal**

Foram avaliados neste estudo 345 acessos de pinhão manso, depositados no banco de germoplasma do Laboratório de Fisiologia Vegetal e Cultura de Tecidos do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de São Carlos, Araras, SP. Os acessos estão distribuídos em 51 populações, originadas de diversos estados brasileiros (São Paulo, Minas Gerais, Bahia, Goiás, Piauí, Pernambuco e Mato Grosso do Sul) e de países como México, Colômbia, República Dominicana, Paraguai, China, Camboja e Tanzânia (Anexo A). As populações foram coletadas a partir da amostragem de mistura de sementes de árvores de cada localidade, visando obter a máxima variabilidade genética, com o menor número de amostras. Contudo, em alguns casos foram coletadas sementes de plantas isoladas. As populações foram caracterizadas com auxílio dos marcadores microssatélites, sendo o indivíduo 'JC73', de Santa Vitória-MG, escolhido arbitrariamente para ser utilizado como controle positivo em todos os géis.

### 6.2.2 Extração e quantificação do DNA

A extração e quantificação do DNA genômico dos acessos foram descritas com maiores detalhes no Capítulo 3, itens 3.2.3 e 3.2.5.

### 6.2.3 Amplificação do DNA

Oito pares de iniciadores foram utilizados para a análise genética dos acessos de pinhão manso (Tabela 6.1). Nas reações de amplificação dos locos microssatélites foram descritas com maiores detalhes no Capítulo 3, itens 3.2.7.

**Tabela 6.1** - Características de oito marcadores microssatélites, utilizados para avaliação de 51 populações de pinhão manso

<b>Loco</b>	<b>Motivo</b>	<b>Citação</b>
<i>mJCENA</i> 27	(GA) <sub>12</sub>	Desenvolvido para o estudo
<i>mJCENA</i> 41	(AC) <sub>18</sub>	Desenvolvido para o estudo
<i>mJCENA</i> 47	(GT) <sub>7</sub> (GA) <sub>12</sub>	Desenvolvido para o estudo
<i>mJCENA</i> 63	(GA) <sub>17</sub>	Desenvolvido para o estudo
<i>mJCENA</i> 87	(GT) <sub>15</sub> (GA) <sub>8</sub>	Desenvolvido para o estudo
JCSSR 68	(AGA) <sub>7</sub>	Sun et al. (2008)
JCSSR 116	(AC) <sub>12</sub>	Sun et al. (2008)
JCSSR 308	(TTC) <sub>4</sub> (CTT) <sub>3</sub>	Sun et al. (2008)

### 6.2.4 Análises dos dados

Foram estimados parâmetros de diversidade genética para os locos utilizados e para as populações, tais como: número médio de alelos por loco, porcentagem de locos polimórficos, heterozigiosidade média observada, diversidade gênica (heterozigiosidade esperada), índice de fixação e os parâmetros de diversidade de Cocherham, obtidos com o auxílio do programa GDA (*Genetic Data Analysis*) (LEWIS; ZAYKIN, 2006). As frequências alélicas e a distribuição da diversidade genética entre e dentro das populações, verificada pela estatística

de Nei (1973), foram estimados utilizando o programa FSTAT (GOUDET, 2001). Visando conhecer a distribuição da diversidade genética entre e dentro de populações em três níveis hierárquicos, tais como: (I) populações em geral, (II) América versus demais países, e (III) populações do Brasil, foram realizadas Análises de Variância Molecular (AMOVA), com o auxílio do programa Arlequin 3.11 (EXCOFFIER et al., 2005).

A análise de coordenadas principais (PCA) foi realizada com auxílio do programa PAST (HAMMER et al., 2001) para visualização da distância genética entre os acessos em três níveis hierárquicos. O primeiro foi realizado com base no país de origem, o segundo comparando os acessos americanos e terceiro entre os acessos brasileiros. Análises de agrupamento foram obtidas a partir das distâncias genéticas de Nei (1972), utilizando o método aglomerativo UPGMA (*Unweighted pair group method of arithmetic averages*), com auxílio do programa TFPGA (MILLER, 1997). Além disso, foi incluído na análise um indivíduo de pinhão bravo (*Jatropha pohliana* M.), visando representar a distância genética entre as espécies.

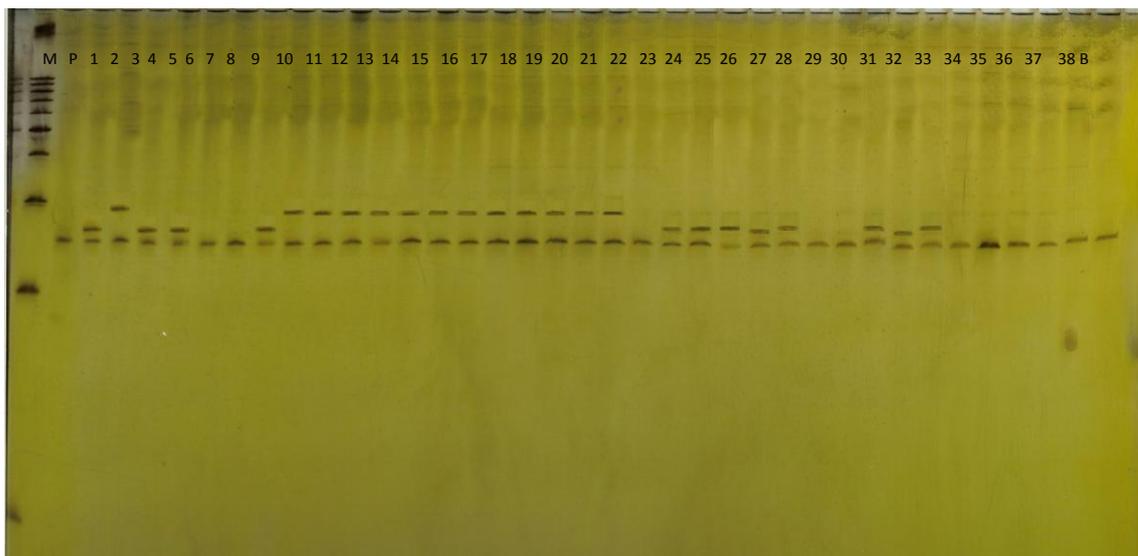
## **6.3 Resultados e Discussão**

### **6.3.1 Diversidade genética**

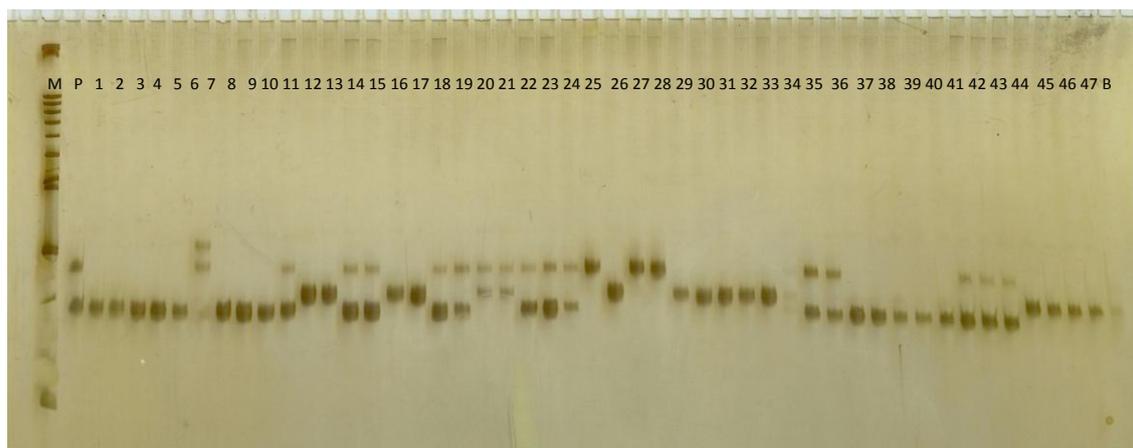
Oito pares de iniciadores apresentaram perfis polimórficos (*mJCENA27*, *mJCENA41*, *mJCENA47*, *mJCENA63*, *mJCENA87*, *JCSSR68*, *JCSSR116* e *JCSSR308*; Figuras 6.1, 6.2, 6.3, 6.4, 6.5 e 6.6).



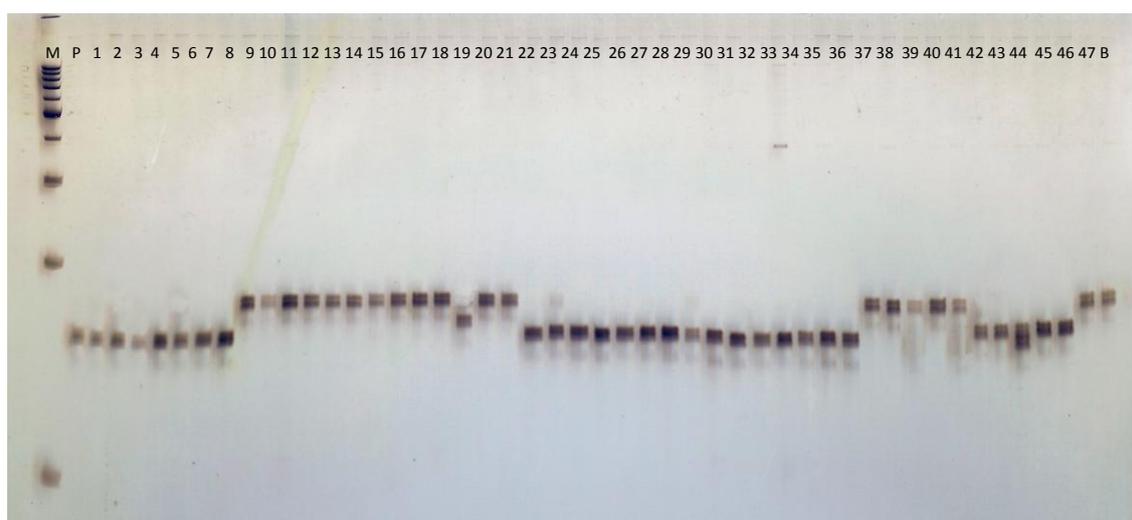
**Figura 6.1** - Padrão de amplificação gerado pelo loco *mJCENA87*. M: marcador 100 pb; P: controle positivo; Acessos (1 a 9 – Janaúba, MG; 10 a 14 – Oracila, MG; 15 a 19 – Paraguaçu, MG; 20 a 24 – Bento, MG; 25 a 29 – Filomena, MG; 30 a 34 – Torres; 35 a 42 – Pernambuco, 1; 43 a 48 – Taubaté, SP; B: branco



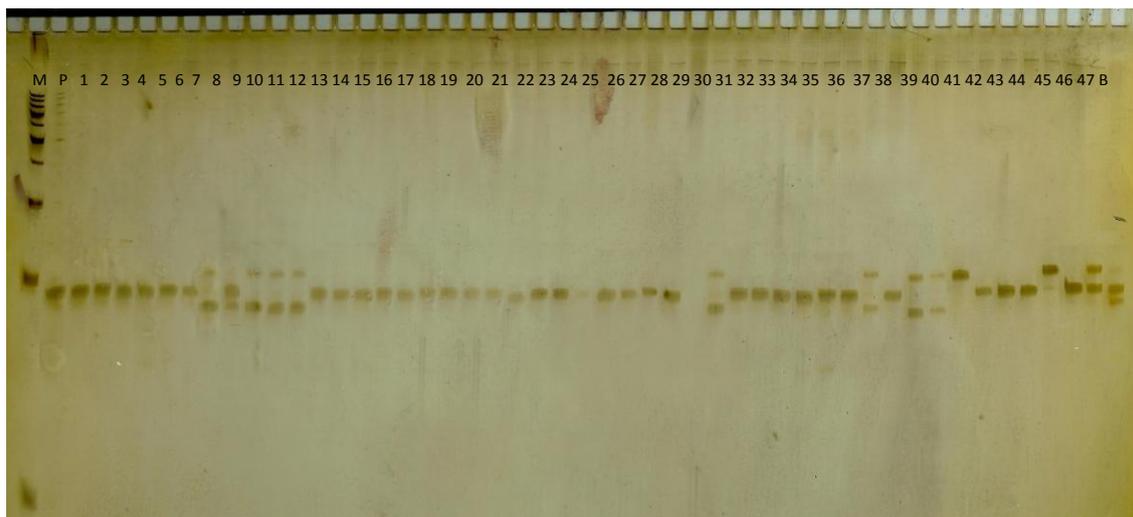
**Figura 6.2** - Padrão de amplificação gerado pelo loco *JC116*. M: marcador 100 pb; P: controle positivo; Acessos (1 a 7 – Irecê 1, BA; 8 a 13 – Camboja, 1; 14 a 19 – Camboja, 2; 20 a 29 – Jussara, GO; 30 a 38 – Montes Claros de Goiás, GO; B: branco



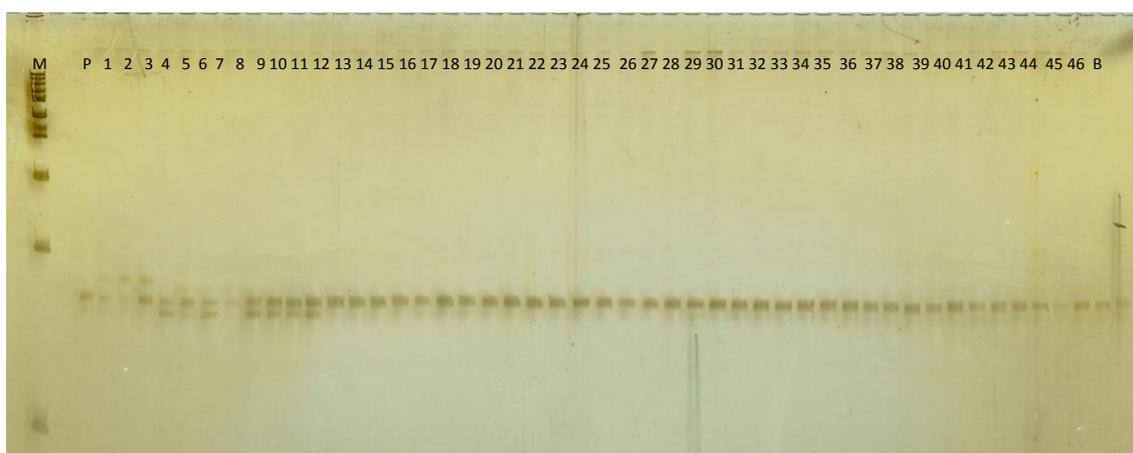
**Figura 6.3** - Padrão de amplificação gerado pelo loco *mJCENA27*. M: marcador 100 pb; P: controle positivo; Acessos (1 a 8 – México, 2; 9 a 15 – México, 3; 16 a 21 – México, 4; 22 a 31 – Colômbia, 1; 32 a 36 – Colômbia, 2; 37 a 41 – Colômbia, 3; 42 a 47 – Colômbia, 4; B: branco



**Figura 6.4** - Padrão de amplificação gerado pelo loco *mJCENA41*. M: marcador 100 pb; P: controle positivo; Acessos (1 a 7 – Jussara, GO; 8 a 12 – Holambra, SP; 13 a 17 – Araras, SP; 18 a 20 – Santa Rosa, SP; 21 a 25 – Oracila, MG; 26 a 30 – Paraguaçu, MG; 31 a 35 – Bento, MG; 36 a 40 – CCA/Araras, SP; 41 a 45 – Santa Vitória, MG; 46 e 47 – Taubaté, SP; B: branco



**Figura 6.5** - Padrão de amplificação gerado pelo loco *mJCENA47*. M: marcador 100 pb; P: controle positivo; Acessos (1 a 5 – S.M. do Araguaia, GO; 6 a 11 – México, 4; 12 a 18 – China, 1; 19 a 22 – China, 2; 23 a 29 – China, 3; 30 a 37 – Pernambuco, 2; 38 a 42 – Camboja, 2; 43 a 47 – Irecê, BA; B: branco.



**Figura 6.6** - Padrão de amplificação gerado pelo loco *mJCENA63*. M: marcador 100 pb; P: controle positivo; Acessos (1 a 3 – Paraguai, 1; 4 a 11 – México, 2; 12 a 21 – Colômbia, 9; 22 a 31 – Colômbia, 10; 32 a 41 – Colômbia, 11; 42 a 46 – Colômbia, 5; B: branco

A partir desses locos foram detectados 55 alelos, onde o número de alelos variou de 3 a 12 por loco, sendo a média de 7,25 alelos. O loco que apresentou maior número de alelos foi o *mJCENA27* (12 alelos), e com menor número foi o *JCSSR308* (três alelos). Entre as populações, o número médio de alelos por loco variou de 1,25 (População 21 e na População 26) a 2,25 (População 37), com média de 1,55 alelos por loco (Tabela 6.2 e 6.3).

O número de alelos por loco foi superior aos outros trabalhos que empregaram SSR com pinhão manso (SUN et al., 2008; SUDHEER PAMIDIMARRI et al., 2009; ROSADO et

al., 2010, YAOWALAK, et al., 2011), possivelmente pela qualidade dos locos aqui desenvolvidos e pela característica intrínsecas das populações analisadas (maior número de populações e acessos, assim como a origem dos mesmos). O polimorfismo revelado favoreceu a identificação dos indivíduos e conseqüentemente das populações, permitindo a avaliação da distribuição da diversidade genética entre e dentro das regiões.

Em termos gerais, as 51 populações estudadas apresentam níveis de riqueza alélica relativamente alta, quando comparada com a maioria dos trabalhos de caracterização da diversidade para o pinhão manso, desenvolvidos na Índia utilizando marcadores moleculares como *Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD)*, *Inter Simple Sequence Repeats (ISSR)*, *Direct Amplified Minisatellite DNA (DAMD)* e microssatélites (GINWAL et al., 2004; BASHA; SUJATHA, 2007; KAUSHIK et al., 2007; RANADE et al., 2008; SUDHEER PAMIDIMARRI et al., 2009), onde todos os marcadores indicam pequena diversidade genética entre os acessos. Na China, Sun et al. (2008) avaliaram a diversidade genética de 58 acessos de pinhão manso mantidos no banco de germoplasma do *South China Botanical Garden*, sendo 56 de procedência chineses e dois da Malásia. Utilizando iniciadores microssatélites específicos desenvolvidos a partir da técnica (*FIASCO - Fast Isolation by AFLP of Sequences Containing repeats*), 30 seqüências microssatélites foram selecionadas para o desenvolvimento de iniciadores, sendo que 17 amplificaram, contudo apenas um loco revelou dois alelos para os acessos da Malásia, sendo que os outros 16 pares produziram produtos monomórficos. Desta forma, o marcador microssatélite indicou a existência de limitada diversidade genética entre as amostras do banco de germoplasma. Rosado et al. (2010) avaliando uma coleção de germoplasma, contendo 192 acessos, coletados em diferentes regiões geográficas do Brasil com marcadores RAPD e seis locos de microssatélites e encontraram limitada diversidade genética detectando dez alelos no total, ou seja, cada loco microssatélite produziu de um a dois alelos. Yaowalak et al. (2011) avaliando também uma coleção de germoplasma com 32 indivíduos, provenientes da Tailândia, México, Myamar, Camboja, Índia, República do Laos e China com marcadores cinco locos microssatélites e encontraram limitada diversidade genética detectando 26 alelos, com média de 2,6 por loco. Os autores também destacam a necessidade da ampliação da base genética da coleção, visando no futuro a condução de um programa de melhoramento genético.

As características peculiares do banco de germoplasma da UFSCar podem explicar o elevado nível de riqueza alélica detectado, pois a coleção é formada por acessos de diversas origens geográficas de pinhão manso. Os acessos que representam o continente americano são constituídos pelas populações do Brasil, Colômbia, México, Paraguai e República

Dominica. Da África, o banco conta com acessos da Tanzânia, e da Ásia, duas fontes de acessos do Camboja e três variedades melhoradas para teor de óleo da China. Carels (2009) relata que fósseis mais antigos do gênero *Jatropha* foram encontrados no Peru, correspondente a era Cenozóica, ou seja, o gênero teria se desenvolvido na América do Sul em um período anterior a junção do continente americano. Sendo assim, o pinhão manso teria migrado recentemente para o centro da América, uma vez que não foi encontrado na África antes da sua introdução por humanos (Carels, 2009).

As populações apresentaram valores de heterozigose observada  $H_o$  entre 0,05 a 0,99 (com média de 0,47) e entre 0,07 a 0,87 (com média de 0,66) para a  $H_e$  para oito locos avaliados (Tabela 6.2).

**Tabela 6.2** - Característica do loco e parâmetros de diversidade genética, número de alelos por loco ( $A$ ), heterozigosidade observada ( $H_o$ ) e heterozigosidade esperada ( $H_e$ ), avaliados para oito locos genômicos de microssatélites em 51 populações de pinhão manso

<b>Loco</b>	<b>Tamanho do alelo (bp)</b>	<b><math>A</math></b>	<b><math>H_o</math></b>	<b><math>H_e</math></b>
<i>mJCENA 27</i>	199	11	0,33	0,84
<i>mJCENA 41</i>	170	10	0,59	0,87
<i>mJCENA 47</i>	215	12	0,35	0,78
<i>mJCENA 63</i>	158	4	0,05	0,52
<i>mJCENA 87</i>	214	9	0,42	0,83
JCSSR 68	165	4	0,99	0,64
JCSSR 116	370	5	0,99	0,71
JCSSR 308	165	3	0,07	0,07
<b>Média</b>		<b>7,25</b>	<b>0,47</b>	<b>0,66</b>

As populações apresentaram valores de  $H_o$  entre 0,25 (População 21 e 22 e População 26) a 0,88 (População 38), com média de 0,43 e entre 0,13 (População 21 e 22) a 0,58 (População 36), com média de 0,25 para a  $H_e$  (Tabela 6.3). Nota-se que os valores de diversidade gênica foram, em geral, menores que a heterozigosidade observada. Além disso,

as quatro populações do México foram as que apresentaram valores mais elevados de diversidade, para todos os parâmetros avaliados.

**Tabela 6.3** - Parâmetros de diversidade genética, incluindo populações (Pop.), número de acessos avaliados (n), porcentagem de locos polimórficos (*P*), número médio de alelos por loco (*A*), heterozigosidade observada (*H<sub>o</sub>*) e diversidade gênica (*H<sub>e</sub>*), a partir de microssatélites genômicos avaliados para 51 populações de pinhão manso

<b>Identificação</b>	<b>Pop.</b>	<b>n</b>	<b><i>P</i>(%)</b>	<b><i>A</i></b>	<b><i>H<sub>o</sub></i></b>	<b><i>H<sub>e</sub></i></b>
Lins-SP	1	10	0,38	1,38	0,38	0,20
Holambra-SP	2	5	0,75	1,86	0,68	0,43
Araras-SP	3	5	0,75	1,75	0,65	0,39
Sta Rosa-SP	4	5	0,50	1,50	0,43	0,25
Taubaté-SP	5	6	0,75	1,88	0,71	0,42
CCA/Araras-SP	6	5	0,75	1,75	0,63	0,38
Jales-SP	7	5	0,38	1,38	0,38	0,21
SM Araguaia-GO	8	5	0,50	1,50	0,50	0,28
Jussara-GO	9	9	0,63	1,63	0,58	0,32
Itapirapuã-GO	10	10	0,50	1,50	0,50	0,26
Britânia-GO	11	10	0,63	1,63	0,63	0,33
MC de Goiás-GO	12	10	0,63	1,63	0,63	0,33
Sta Vitória-MG	13	5	0,50	1,50	0,50	0,28
Uberlândia-MG	14	5	0,50	1,50	0,50	0,28
Janaúba-MG	15	9	0,63	1,75	0,63	0,34
Oracila-MG	16	5	0,50	1,50	0,50	0,28
Paraguaçu-MG	17	5	0,63	1,75	0,53	0,32
Bento-MG	18	5	0,38	1,38	0,38	0,21
Filomena-MG	19	5	0,50	1,50	0,48	0,28
Torres-MS	20	5	0,38	1,38	0,38	0,21
Pernambuco 1	21	9	0,25	1,25	0,25	0,13
Pernambuco 2	22	8	0,25	1,38	0,25	0,13
Irecê 1-BA	23	7	0,38	1,38	0,38	0,20

(continua)

(conclusão)

<b>Identificação</b>	<b>Pop.</b>	<b>n</b>	<b>P(%)</b>	<b>A</b>	<b>H<sub>o</sub></b>	<b>H<sub>e</sub></b>
Irecê 2-BA	24	7	0,38	1,38	0,38	0,20
Cruz-BA	25	5	0,38	1,38	0,38	0,21
Barras-PI	26	5	0,25	1,25	0,25	0,14
China-var.1	27	7	0,50	1,50	0,50	0,27
China-var.2	28	4	0,50	1,50	0,44	0,27
China-var.3	29	8	0,63	1,63	0,55	0,31
Camboja-1	30	11	0,50	1,63	0,39	0,22
Tanzânia	31	9	0,38	1,38	0,38	0,20
Rep. Dom.	32	8	0,38	1,38	0,38	0,20
Camboja-2	33	5	0,38	1,38	0,38	0,21
Paraguai-1	34	3	0,50	1,50	0,46	0,30
Paraguai-2	35	2	0,38	1,38	0,38	0,25
México-1	36	2	0,75	2,00	0,75	0,58
México-2	37	8	0,75	2,00	0,69	0,43
México-3	38	7	0,88	2,13	0,88	0,50
México-4	39	6	0,75	2,25	0,58	0,45
Colômbia-1	40	10	0,50	1,63	0,36	0,22
Colômbia-2	41	5	0,50	1,50	0,45	0,27
Colômbia-3	42	5	0,50	1,88	0,48	0,31
Colômbia-4	43	5	0,50	1,50	0,48	0,28
Colômbia-5	44	5	0,50	1,58	0,50	0,28
Colômbia-6	45	10	0,50	1,50	0,44	0,25
Colômbia-7	46	10	0,38	1,38	0,38	0,20
Colômbia-8	47	10	0,50	1,50	0,48	0,26
Colômbia-9	48	10	0,50	1,50	0,50	0,26
Colômbia-10	49	10	0,38	1,38	0,38	0,20
Colômbia-11	50	10	0,50	1,50	0,50	0,26
Colômbia-12	51	5	0,50	1,50	0,43	0,25
<b>Média</b>		<b>6,60</b>	<b>0,51</b>	<b>1,55</b>	<b>0,43</b>	<b>0,25</b>

### 6.3.2 Estrutura genética

Com relação aos parâmetros de diversidade genética de Nei (1973), foi verificada a existência de grande variabilidade genética para o total de acessos analisados ( $H_T = 0,65$ , Tabela 6.4). A partição da diversidade genética das 51 populações revela que a maior parte encontra-se distribuída entre as mesmas ( $G_{ST} = 0,62$ ;  $\theta = 0,62$ ;  $R_{ST} = 0,87$ ). A estatística  $R_{ST}$  (SLATKIN, 1995) é uma medida de diversidade genética entre populações, desenvolvida para o marcador microssatélites. Esta estatística considera o modelo de mutações aos saltos, no qual alelos podem ser idênticos em estado, apenas porque a mutação aumentou ou diminuiu a mobilidade eletroforética de um alelo em uma unidade (ROUSSET, 1996). Para estimar o parâmetro  $R_{ST}$ , o genótipo de cada indivíduo é definido a partir do seu tamanho em pares de base. A natureza do processo de estimação do parâmetro  $R_{ST}$  permite que alguns erros de genotipagem dos marcadores microssatélites fiquem diluídos na variância da estimativa. Neste trabalho, o valor  $R_{ST}$  sob todos os locos foi de 0,87, indicando a existência de muitos alelos em comum entre as populações. Os índices de fixação dentro das populações foram de 0,25 ( $H_S$ ) e -0,90 ( $f$ ). (Tabela 6.4).

O pinhão manso é uma espécie monóica, com flores masculinas e femininas na mesma inflorescência e com diferença temporal na antese, favorecendo assim a ocorrência de cruzamentos e, portanto, a recombinação dos genes e o aumento da heterozigose (GINWAL et al., 2004; LUO et al., 2007; LIU et al., 2008; ROSADO et al., 2010).

Analisando a diversidade genética total (NEI, 1973), verifica-se que existe grande variabilidade genética para as populações analisadas ( $H_T = 0,65$ , Tabela 6.4), sendo que grande parte desta diversidade se deve à variabilidade entre populações ( $G_{ST} = 0,62$ ). O mesmo resultado foi obtido estimando a diferenciação genética entre populações pelo método de Weir e Cockerham (1984), baseado na análise de variância de frequências gênicas ( $\theta = 0,62$ ) (Tabela 6.4). Este resultado é surpreendente, visto que, em geral, espécies arbóreas tropicais, devido à reprodução ocorrer predominantemente por cruzamentos, tendem a dispersar seus genes a longas distâncias, conectando populações e assim, reduzindo a diferenciação genética entre as mesmas. Contudo, o presente resultado demonstra que o pinhão manso utiliza outras estratégias para manutenção da diversidade da espécie. Novos estudos sobre a distribuição da diversidade genética entre populações, sistema de reprodução, dispersão de pólen e sementes baseados em populações de pinhão manso são necessários para o adequado entendimento de como a diversidade genética está organizada na espécie.

**Tabela 6.4** - Frequências alélicas e a estrutura genética, diversidade dentro de populações ( $H_s$ ), diversidade total ( $H_t$ '), proporção da diversidade genética entre populações ( $G_{ST}$ '), índice de fixação para a espécie ( $F$ ), divergência genética entre as populações ( $\theta$ ), índice de fixação dentro da espécie ( $f$ ) e Índice de fixação ( $R_{st}$ ), avaliados para oito locos microssatélites em 51 populações de pinhão manso

<b>Loco</b>	<b><math>H_s</math></b>	<b><math>H_t'</math></b>	<b><math>G_{ST}'</math></b>	<b><math>F</math></b>	<b><math>\theta</math></b>	<b><math>f</math></b>	<b><math>R_{st}</math></b>
<i>mJCENA27</i>	0,20	0,65	0,76	0,61	0,78	- 0,73	0,95
<i>mJCENA41</i>	0,34	0,87	0,61	0,35	0,62	- 0,74	0,87
<i>mJCENA47</i>	0,20	0,83	0,76	0,57	0,79	- 0,92	0,81
<i>mJCENA63</i>	0,02	0,51	0,96	0,90	0,95	- 0,70	0,43
<i>mJCENA87</i>	0,22	0,83	0,74	0,53	0,73	- 0,83	0,89
JCSSR 68	0,50	0,56	0,10	- 0,76	0,12	- 1,00	0,85
JCSSR 116	0,50	0,72	0,30	- 0,31	0,30	- 0,96	0,08
JCSSR 308	0,03	0,06	0,50	0,03	0,51	- 1,00	0,68
<b>Média</b>	<b>0,25</b>	<b>0,65</b>	<b>0,62</b>	<b>0,29</b>	<b>0,62*</b>	<b>- 0,90*</b>	<b>0,87</b>

\*  $P < 0,05$  Correção de Bonferroni

Ressalta-se que existem indícios que sugerem que o germoplasma de pinhão manso esteja sofrendo a influência da ação antrópica, onde a diversidade genética dentro das populações é menor que entre, ou seja, o homem tem propagado a cultura tanto por propágulos vegetativos como pela multiplicação via sementes, onde poucas plantas são utilizadas como matrizes (ROSADO et al., 2010).

A análise de variância molecular (AMOVA) foi utilizada para analisar a estrutura genética das populações de pinhão manso nos diferentes níveis hierárquicos: (I) entre e dentro das populações, considerando as 51 populações, em geral; (II) entre regiões, considerando duas regiões (América versus demais países), entre populações dentro de regiões, e dentro de populações; (III) entre e dentro populações, considerando somente as populações originárias do Brasil. Os resultados demonstraram que a maior parte da variação genética foi encontrada entre as populações (58%), enquanto que a variação dentro de populações foi de 41% (Tabela 6.5), sendo que todos os componentes de variância foram altamente significativos ( $P < 0,001$ ). Quando foram comparadas duas regiões (América versus demais países), verifica-se que a maior parte da variabilidade concentra-se entre populações dentro de regiões (53%), seguida da variabilidade dentro de populações (39%), sendo que apenas 9% da variação são explicadas pela diferença dentro de regiões. Analisando somente as populações brasileiras, verifica-se que a maior parte da diversidade encontra-se entre as mesmas (54%, Tabela 6.5), embora uma parte considerável da diversidade se deva à diferenciação dentro de populações (46%). O valor de  $F_{st}$  estimado para as populações de pinhão manso foi de 0,58, com um número de migrantes por geração ( $Nm$ ) de 0,18 indivíduos entre as populações. Na comparação entre as populações americanas e as demais o valor de  $F_{st}$  estimado foi de 0,61, com  $Nm$  de 0,16 indivíduos entre as populações. No Brasil, o valor de  $F_{st}$  estimado foi de 0,54, com  $Nm$  de 0,21, indicando a existência de um maior fluxo gênico entre as populações brasileiras possivelmente devido à menor distância geográfica entre as mesmas (Tabela 6.5).

**Tabela 6.5** - Resultados da análise de variância molecular (AMOVA) considerando a distribuição da diversidade entre e dentro de populações em três níveis hierárquicos: (I) populações em geral, (II) América versus demais países, e (III) populações do Brasil, com base na amplificação de oito locos microssatélites

Fonte de variação	F <sub>ST</sub>	N <sub>m</sub>	GL	SQ	%	Valor
<b>I</b>	0,58	0,18				
Entre populações			50	1093,4	58,0	0,000
Dentro de populações			294	692,4	41,0	0,000
<b>II</b>	0,61	0,16				
Entre regiões			1	62,85	9,0	0,000
Entre populações dentro de regiões			49	1030,7	53,0	0,000
Dentro de populações			294	692,4	39,0	0,000
<b>III</b>	0,54	0,21				
Entre populações			25	384,1	54,3	0,000
Dentro de populações			170	324,5	45,7	0,000

<sup>1</sup> número de permutações = 1000; F<sub>ST</sub>, índice de fixação de Wright; N<sub>m</sub>, número de migrantes por geração; GL, graus de liberdade; SQ, soma de quadrados

A análise de coordenadas principais (PCA) mostrou as diferenças entre os acessos dos países de origem distribuídos em sete grupos: Brasil (BR), Paraguai (PAR), Colômbia (COL), China (CH), Tanzânia (TAZ), Camboja (CAM) e México (MEX) (Figura 6.7). Foi observada uma sobreposição dos acessos do Brasil com o Paraguai, Tanzânia e Camboja (CAM), enquanto que os outros grupos mostraram-se separados. Com o objetivo de refinar as diferenças encontradas dentro de cada grupo, outras análises de PCA foram realizadas.

Comparando os acessos americanos, verificou-se que os brasileiros continuam se sobrepondo aos paraguaios e os provenientes da Colômbia e México continuam formando grupos distintos (Figura 6.8).

As análises de coordenadas principais revelam a existência de variabilidade genética significativa entre os acessos brasileiros, colombianos e mexicanos, e a proximidade dos acessos cultivados na África e Ásia a esses três grupos. Esse resultado é semelhante ao encontrado por Basha et al. (2009) e Yaowalak et al. (2011), onde os acessos mexicanos ficaram distantes dos cultivados em outras partes do mundo. E no presente estudo, observou-se inclusive maior diversidade genética para os acessos mexicanos (Tabela 6.4). Contudo, a menor diversidade dentro dos acessos quando comparado entre os mesmos pode ser explicada pela pequena abundância de plantas na natureza, isolamento das populações e fluxo gênico limitado (ALVES et al., 2007).

Em relação aos acessos brasileiros, foi verificada uma sobreposição daqueles provenientes de São Paulo (SP) com os de Minas Gerais (MG) e Mato Grosso do Sul (MS), fato também observado nos acessos do nordeste (Bahia-BA, Pernambuco-PE e Piauí-PI), enquanto que os acessos de Goiás (GO) formaram um grupo separado dos demais (Figura 6.9).

A diversidade genética regional fica evidente nas análises de coordenadas principais (Figuras 6.7, 6.8 e 6.9), onde os acessos são agrupados de acordo com suas regiões geográficas, reforçando que o isolamento por distância pode estar favorecendo a diversidade entre os acessos. Lemes et al. (2003) e Azevedo et al. (2007) relatam o mesmo fenômeno em árvores tropicais. Butcher et al. (2005) relatam que o fluxo gênico restrito pode favorecer a grande diversidade entre os acessos e pequena entre os mesmos.

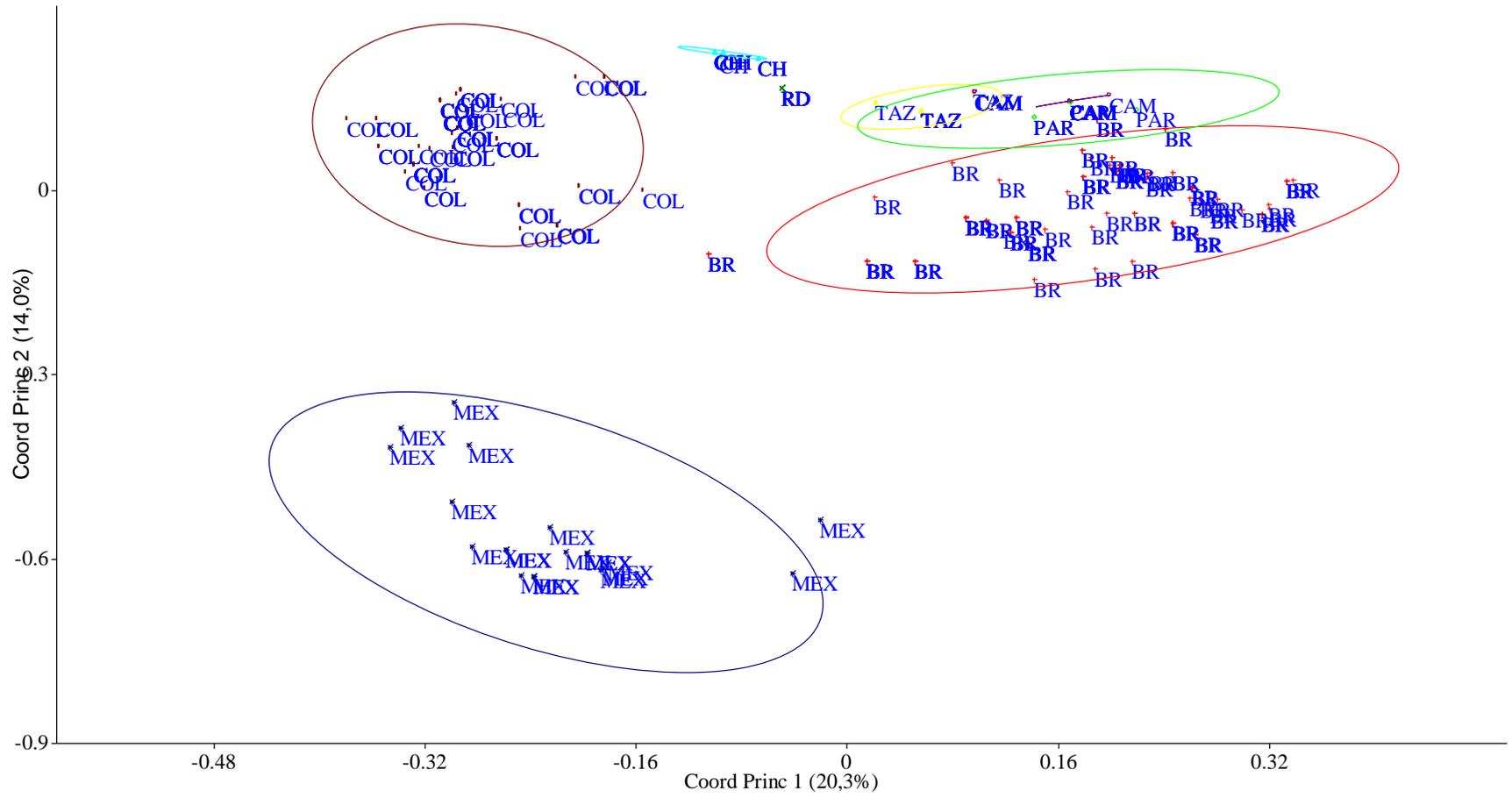
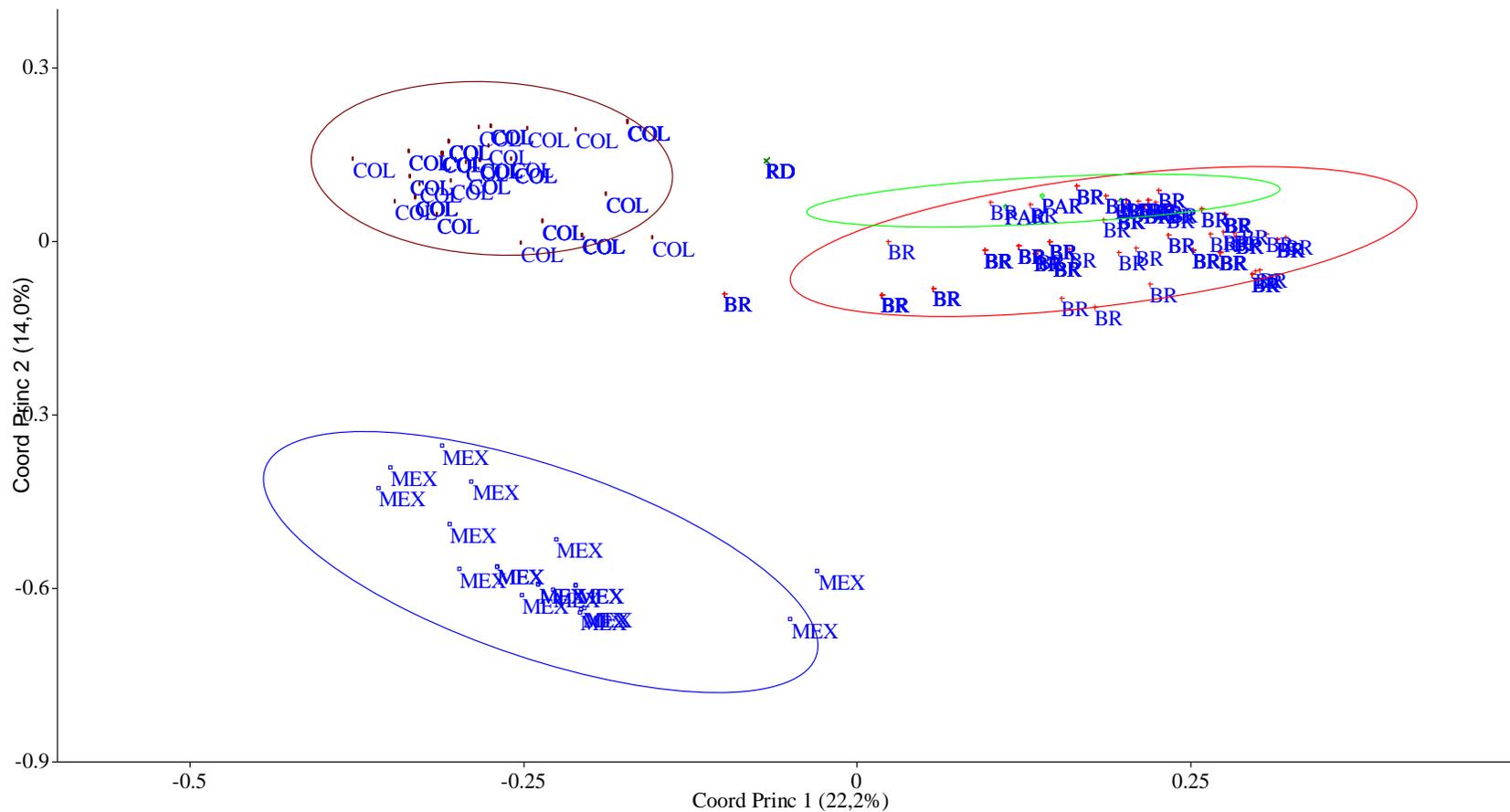
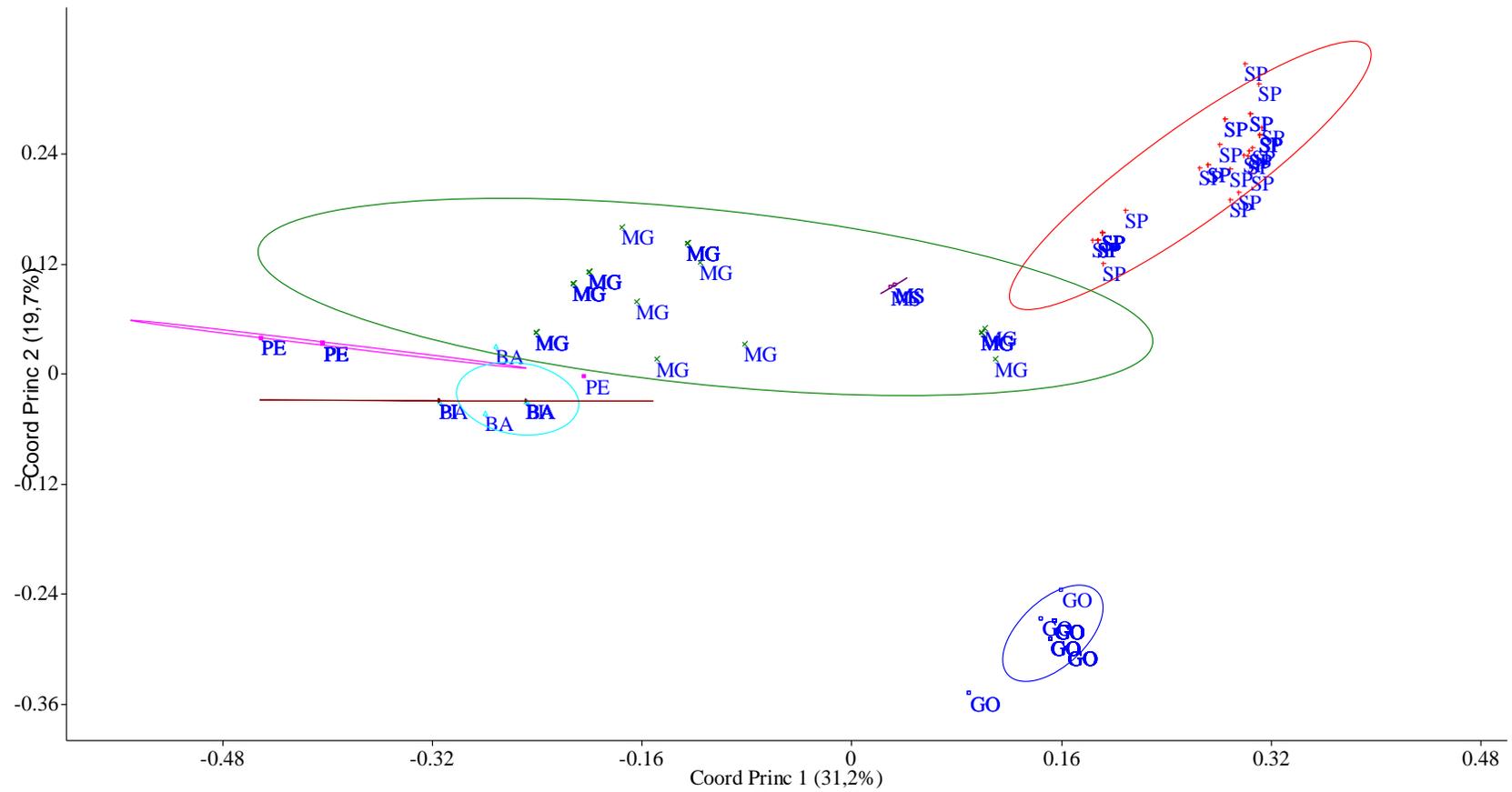


Figura 6.7 – Gráfico de dispersão obtido na análise de coordenadas principais para 345 acessos de pinhão manso agrupados em 51 populações



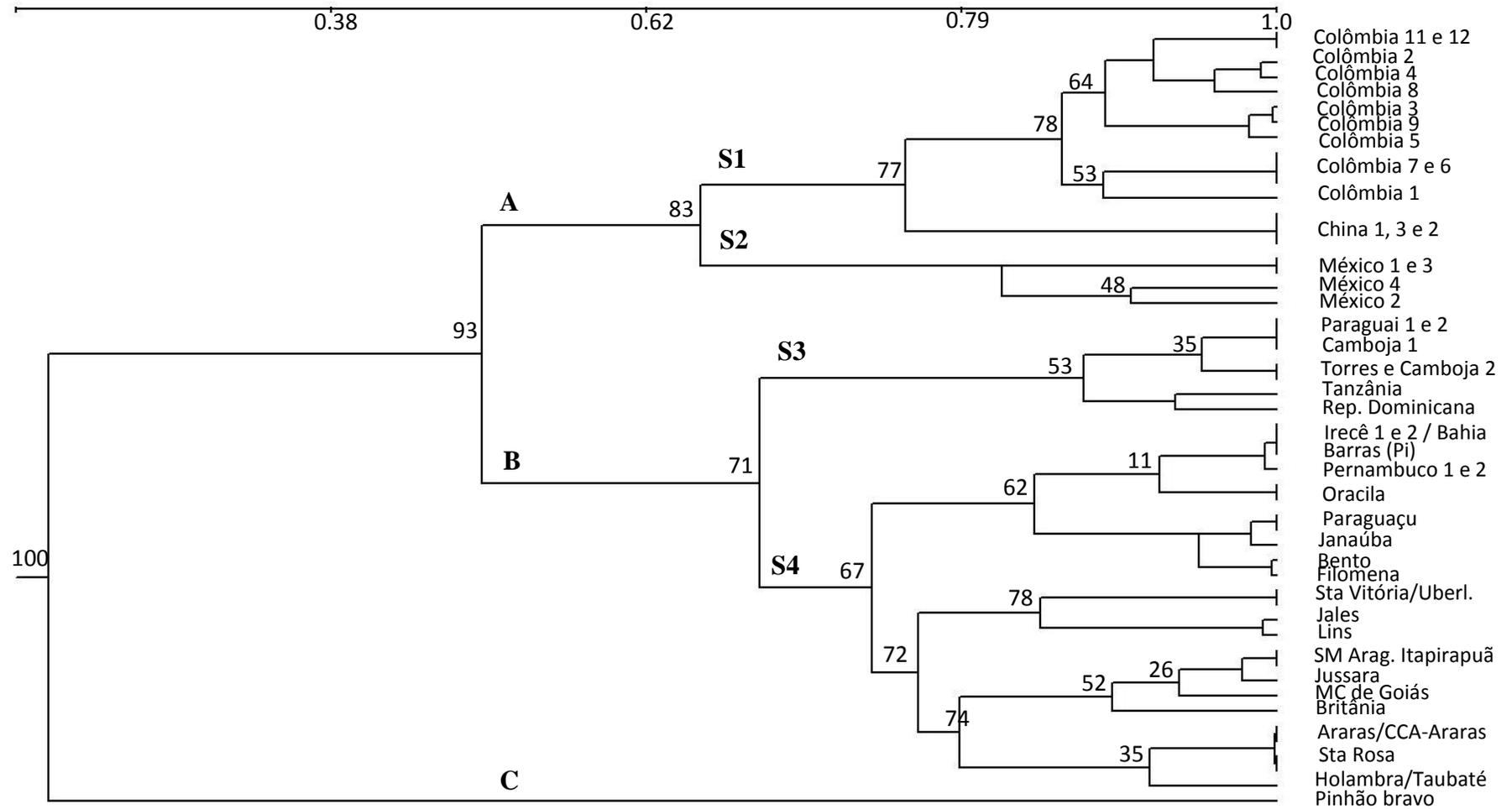
**Figura 6.8** - Gráfico de dispersão obtido na análise de coordenadas principais para acessos de pinhão manso do continente americano. Brasil (170 acessos); Colômbia (95 acessos); México (23 acessos); República Dominicana (8 acessos) e Paraguai (5 acessos)



**Figura 6.9** - Gráfico de dispersão obtido na análise de coordenadas principais para acessos brasileiros de pinhão manso. São Paulo - SP (41 acessos); Minas Gerais - MG (44 acessos); Mato Grosso do Sul - MS (5 acessos); Goiás - GO (44 acessos); Bahia - BA (19 acessos); Pernambuco - PE (17 acessos) e Piauí - PI (5 acessos)

Uma análise de agrupamento baseada nas distâncias genéticas de Nei (1972), pelo método UPGMA foi realizada para identificar as inter-relações entre as populações avaliadas. O dendrograma obtido mostrou a separação das populações em três grandes grupos, tendo-se como critério de separação dos grupos o valor de *bootstrap*, ou seja, da confiabilidade dos grupos formados, acima de 93% (Figura 6.10). O grupo A foi formado pelas populações da Colômbia, China e México, já no B encontra-se as demais populações de pinhão manso estudadas e no C o pinhão bravo. Os grupos A e B foram subdivididos em subgrupos. No grupo A, com 83% de confiabilidade, formaram-se os subgrupos S1 – Colômbia e China e S2 – México. No grupo B, com 71% de confiabilidade, formaram-se os subgrupos S3 – Paraguai, Camboja, Brasil – MS (Torres), República Dominicana e Tanzânia e S4 – contendo as populações brasileira dos estados de São Paulo, Minas Gerais, Bahia, Goiás, Pernambuco e Piauí (Irecê, BA, Pernambuco, Piauí, Paraguaçu, Filomena, Janaúba, Oracila, Bento, Sta Vitória, Uberlândia, Lins, Jales, São Miguel do Araguaia, Itapirapuã, Jussara, Montes Claros de Goiás, Britânia; Araras, CCA-Araras, Holambra, Taubaté, Sta Rosa), os quais encontram-se de acordo com os resultados obtidos pelas análises de coordenadas principais.

Os grupos revelam uma associação entre a diversidade molecular e a origem dos mesmos, além de demonstrar a existência de isolamento por distância entre as populações do continente americano. Quanto às populações cultivadas no sudeste asiático e na África (Tanzânia) continuam próximas geneticamente das populações americanas. Muito distante geneticamente das populações de pinhão manso ficou a espécie *Jatropha pohliana* M. (pinhão bravo) utilizado como um controle (Figura 6.10).



**Figura 6.10** - Representação gráfica da análise de agrupamento, baseada nas distâncias genéticas de Nei (1972) de 51 populações e um controle positivo (pinhão bravo), pelo método UPGMA, utilizando oito locos microsatélites

Resultados semelhantes foram observados por Basha e Sujatha (2007), onde 83% dos acessos indianos avaliados foram agrupados em dois grandes grupos, enquanto que o acesso mexicano formou um grupo unitário. Basha et al. (2009) estudando genótipos de *J. curcas* de várias regiões do mundo verificaram a formação de dois agrupamentos, sendo um composto por acessos da América Central (México e El Salvador), e o outro grupo formado por acessos de outras regiões. Rosado et al. (2010) analisando 192 acessos brasileiros de diversos Estados, detectaram a formação de sete grupos, porém também ficou evidente que acessos de diferentes regiões possuem uma ancestralidade comum. Yaowalak et al. (2011) conseguiram separar os acessos mexicanos (não tóxicos) dos tóxicos cultivados no sudeste asiático.

A maior diversidade genética foi encontrada nas populações originárias do México, demonstrando que possivelmente o centro de origem e diversidade genética da espécie encontra-se neste país. A disparidade entre a distribuição geográfica do pinhão manso no Brasil é um dos fatores que podem impactar sobre a diversidade genética das populações entre as diferentes regiões. Outro ponto observado, é que populações da mesma região possuem a tendência de se concentrarem no mesmo grupo, ou seja, a diversidade genética entre as diferentes populações está estreitamente relacionada com sua origem geográfica (Figuras 6.7, 6.8, 6.9 e 6.10).

Os baixos níveis de diversidade genética do pinhão manso em muitos países são explicados pela provável dispersão de espécies nativas do México e da América do Sul pelos portugueses para ilhas de Cabo Verde e Guiné-Bissau para outros países da África e da Ásia (HELLER, 1996). Na Tailândia, os baixos níveis de diversidade reforçam a hipótese que o pinhão manso foi introduzido pelos Portugueses e multiplicados via propagação vegetativa (RATREE, 2004), possivelmente a partir de poucos genótipos. Na Índia, a base genética estreita tem sido atribuída ao pequeno número de plantas introduzidas e sua propagação vegetativa e o mesmo pode ter ocorrido na China (SUN et al., 2008).

Os locos microssatélites também podem inferir sobre o sistema reprodutivo da espécie. O pinhão manso é uma espécie monóica, desta forma, espera-se que os locos estejam em heterozigose, devido ao favorecimento do sistema reprodutivo por alogamia. Muitas populações amostradas neste estudo apresentam alta heterozigose, ou seja, as plantas estão se reproduzindo preferencialmente pela fecundação cruzada. Resultados semelhantes foram obtidos por Sun et al. (2008) na Índia, e Rosado et al. (2010) no Brasil.

### 6.3.3 Impactos na conservação e melhoramento genético

O pinhão manso não é uma espécie em extinção, porém o recente interesse pelo conteúdo de óleo das sementes e conseqüentemente o melhoramento genético da cultura tornou as plantas isoladas importantes fontes de recursos genéticos. O pinhão manso tem um nível de diversidade satisfatório, com média de heterozigosidade observada ( $H_o = 0,43$ ; Tabela 6.3). Contudo, o desenvolvimento de cultivares tornou-se prioridade, sendo assim, os resultados demonstram que estratégias de conservação do germoplasma devem ser implantadas como a escolha de populações no continente americano, visando buscar características de interesse para os programas de melhoramento genético.

### 6.4 Conclusões

O estudo fornece uma visão abrangente da diversidade genética das populações estudadas. Os resultados demonstram que a diversidade encontra-se estruturada principalmente entre as populações, indicando assim que os programas de conservação e melhoramento genético da espécie devem utilizar materiais genéticos de diferentes procedências.

### Referências

ABDELGADIR, H. A.; JOHNSON, S. D.; VAN STADEN, J. Pollinator effectiveness, breeding system, and tests for inbreeding depression in the biofuel seed crop, *Jatropha curcas*. **Journal Horticultural Scientific Biotechnology**, Kent, UK, v. 84, p. 319-324, 2009.

ALVES, R. M.; SEBBENN, A. M.; ARTERO, A. S.; CLEMENT, C.; FIGUEIRA, A. High levels of genetic divergence and inbreeding in populations of Cupuassu (*Theobroma grandiflorum*). **Tree Genetics and Genomics**, New York, v. 3, p. 289-298, 2007.

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

AZEVEDO, N. C. R.; KANASHIRO, M.; CIAMPI, A. Y.; GRATTAPAGLIA, D. Genetic structure and mating system of *Manikara huberi* (Ducke) A. Chev, a heavily logged Amazonian timber species. **Journal of Heredity**, Washington, DC, v. 98, p. 646-654, 2007.

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

BASHA, S. D.; GEORGE, F.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K.; SUJATHA, M. A comparative study of biochemical traits and molecular markers for assessment of genetic relationships between *Jatropha curcas* L. germplasm from different countries. **Plant Science**, Amsterdam, v. 176, p. 812-823, 2009.

BUTCHER, P. A.; SKINNER, A. K.; GARDINER, C. A. Increased inbreeding and inter-species gene flow in remnant populations of the rare *Eucalyptus benthamii*. **Conservation Genetics**, New York, v. 6, p. 213-226, 2005.

CARELS, N. *Jatropha curcas*: a review. **Advances in Botanical Research**, London, v. 50, p. 40-86, 2009.

EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. **Arlequin ver. 3.1**: an integrated software package for population genetics data analysis. Berne: University of Berne., 2005.

FAIRLESS, D. The little shrub that could—maybe. **Nature**, London, v. 449, p. 652-655, 2007.

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

GOUDET, J. **FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices** (version 2.9.3). Lausanne: Université de Lausanne, 2001. Disponível em: <<http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>>. Acesso em: 22 out. 2001.

HAMMER, Ø.; HAPPER, D. A. T.; RYAN, P. D. **PAST**: paleontological statistics software package for education and data analysis. **Paleontologia Electronica**, Copenhagen K, Denmark, v. 4, n. 1, 9 p., 2001. Disponível em: [http://palaeo-eletronica.org/2001/1/past/issue1\\_01.htm](http://palaeo-eletronica.org/2001/1/past/issue1_01.htm).

HELLER, J. **Physic nut, *Jatropha curcas* L.:** promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. Rome; International Plant Genetic Resource Institute, 1996. 66 p

KANT, P.; WU, S. The extraordinary collapse of *Jatropha* as a Global Biofuel. **Environmental Science & Technology**, Easton, v. 45, n. 17, p. 7114-7115, 2011. doi: 10.1021/es201943v.

KAUSHIK, N.; KUMAR, K.; KUMAR, S.; KAUSHIK, N.; ROY, S. Genetic variability and divergence studies in seed traits and oil content of *Jatropha* (*Jatropha curcas* L.) accessions. **Biomass and Bioenergy**, Amsterdam, v. 31, p. 497–502, 2007.

LEMES, M. R.; GRIBEL, R.; PROCTOR, J.; GRATTAPAGLIA, D. Population genetic structure of mahogany (*Swietenia macrophylla* King, Meliaceae) across the Brazilian Amazon, based on variation at microsatellite *loci*: implications for conservation. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 12, p. 2875-2883, 2003.

LEWIS, P. O.; ZAYKIN, D. **Genetic Data Analysis**: Computer program for the analysis of allelic data. Version 1.0 (d15). 2000. Disponível em: <<http://alleyn.eeb.uconn.edu/gda/2000>> Acesso em 26 nov. 2006.

LIU, H. F.; DENG, Y. F.; LIAO, J. P. Floral organogenesis of three species of *Jatropha* (Euphorbiaceae). **Journal of Systematic and Evolution**, Beijing, v. 46, p. 53–61, 2008.

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

MILLER, M. P. **Tools for Population Genetic Analyses (TFPGA) 1.3**: a windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. Flagstaff, AZ: Department of Biological Sciences, Northern Arizona University, 1997. Disponível em: <http://www.public.asu.edu>.

NEI, M. Genetic distance between populations. **American Naturalist**, Chicago, v. 106, p. 283-292, 1972.

NEI, M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, Washington, DC, v. 7, n. 12, p. 3321-3323, 1973.

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

RANADE, S. A.; SRIVASTANA, A. P.; RANA, T. S.; SRIVASTANA, J.; TULI, R. Easy assessment of diversity in *Jatropha curcas* L. plants using two single-primer amplification reaction (SPAR) methods. **Biomass and Bioenergy**, Amsterdam, v. 32, p. 533-540, 2008.

RATREE, S. A. Preliminary study on physic nut (*Jatropha curcas* L.) in Thailand. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, Faisalabad, Pakistan, v. 7, p. 1620-1623, 2004.

ROSADO, T. B.; LAVIOLA, B. G.; FARIA, D. A.; PAPPAS, M. R.; BHERING, L. L.; QUIRINO, B.; GRATTAPAGLIA, D. Molecular markers reveal limited genetic diversity in a large germplasm collection of the biofuel crop *Jatropha curcas* L. in Brazil. **Crop Science**, Madison, v. 50, p. 2372-2382, 2010.

ROUSSET, F. Equilibrium values of measure of population subdivision for stepwise mutation process. **Genetics**, Pittsburgh, v. 142, p. 1357-1362, 1996.

SATURNINO, H. M.; PACHECO, D. D.; KAKIDA, J.; TOMINAGA, N.; GONÇALVES, N. P. Cultura do pinhão manso (*Jatropha curcas* L.). **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 26, p. 44-74, 2005.

SLATIKIN, M. A measure of population subdivision base on microsatellite allele frequencies. **Genetics**, Pittsburgh, v. 139, p. 457-462, 1995.

SUDHEER PAMIDIMARRI, D. V. N. S.; 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, p. 1357-1364, 2009.

SUN, Q. B.; LI, L. F.; WU, G. J.; GE, X.- J. SSR and AFLP markers reveal low genetic diversity in the biofuel plant *Jatropha curcas* in China. **Crop Science**, Madison, v. 48, p. 1865-1870, 2008.

WEIR, B. S.; COCKERHAM, C. C. Estimating *F*-Statistics for the analysis of population structure. **Evolution**, Lancaster, v. 38, p. 1358–1370, 1984.

YAOWALAK, N.; ARUNEE, W.; THITAPORN, P.; NONGLUCK, K.; RUNGSARID, K.; TANEE, R.; CHALERMPOL, P. Genetic diversity of physic nut (*Jatropha curcas* L.) revealed by SSR markers. **Journal Crop Science Biotechnology**, Heidelberg, v. 14, p. 105-110, 2011.

## 5. CARACTERIZAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA EM PINHÃO MANSO UTILIZANDO MARCADORES MOLECULARES ASSOCIADOS A CARACTERÍSTICAS DAS SEMENTES

### Resumo

O pinhão manso é uma espécie cultivada em várias partes do mundo com potencial para fornecer óleo para produção de biocombustível. Grande parte da diversidade genética do pinhão manso ainda continua desconhecida. Genes envolvidos no desenvolvimento das sementes podem ser usados para fornecer informações sobre a diversidade da espécie. Nosso objetivo foi desenvolver marcador molecular do tipo TRAP (*Target Region Amplified Polymorphism*) para sequências de genes associados ao metabolismo de ácidos graxos e ésteres de forbol durante o desenvolvimento das sementes. Estes marcadores foram utilizados para caracterizar a diversidade genética de 345 acessos distribuídos em 51 populações de pinhão manso de países como México, Colômbia, República Dominicana, China, Camboja, Paraguai, Tanzânia e Brasil, todos depositados no banco de germoplasma da Universidade Federal de São Carlos, Araras, São Paulo. O marcador TRAP é baseado no polimorfismo associado com amplificação entre as regiões de um gene-candidato e um iniciador arbitrário. Treze combinações de genes putativos de uma biblioteca de cDNA construída a partir de sementes em desenvolvimento (cetoacil-ACP redutase [biossíntese de ácidos graxos]; 57B actina; 60S proteína ribossomal L28; nodulin início putative; Enoil-CoA hidratase, *mit. precursor* [metabolismo de ácidos graxos insaturados]; proteína com função desconhecida; Geranyl Pirofosfato Sintase) e de três iniciadores arbitrários geraram 296 fragmentos, variando de 1 a 30 por combinação. As populações Colômbia, México e Brasil apresentaram maior diversidade genética. O marcador TRAP separou as populações mexicanos atóxicas das outras analisadas (tóxicas). O marcador TRAP mostrou-se eficiente para avaliar a diversidade genética dos acessos estudados, e auxiliar no desenvolvimento de uma hipótese para o centro de diversidade de espécie.

**Palavras-chave:** TRAP. Éster de forbol. Ácido graxo. Pinhão manso. Genes.

**Abstract**

*Jatropha curcas* L. is a species cultivated in various parts of the world with potential to provide oil for biofuel production. The organization of the species genetic diversity remains largely unknown. As an oilseed crop, genes involved in seed development could be used to provide information about the diversity of the species. Our goal was to develop Target Region Amplification Polymorphism (TRAP) markers using sequence information for genes associated with metabolism of fatty acid and esters of phorbol during seed development. These markers were used to characterize the genetic diversity of 345 individuals from 51 accessions of *Jatropha* from Mexico, Colombia, Dominican Republic, China, Cambodia, Paraguay and Brazil, all from the germplasm of the 'Universidade Federal de São Carlos', Araras, São Paulo State. TRAP is based on polymorphism associated with amplification between regions of a known candidate gene and a second arbitrary primer. Thirteen combinations of putative genes from a cDNA library constructed from developing seeds (Ketoacyl-ACP Reductase [Fatty acid biosynthesis]; Actin 57B; 60S ribosomal protein L28; Putative early nodulin; Enoyl-CoA hydratase, *mit. precursor* [Metabolism of insaturated fatty acid]; Protein with unknown function; Geranyl Pyrophosphate Synthase) and three arbitrary primers generated 296 fragments, ranging from 1 to 30 per combination. Populations from Colombia, Mexico and Brazil presented higher genetic diversity. TRAP separated the non-toxic Mexican populations from the other toxic populations. TRAP marker proved to be efficient to evaluate the genetic diversity of the accessions studied, and to assist in developing a hypothesis for the center of diversity of the species.

**Keywords:** TRAP. Esters of phorbol. Fatty acid. Physic nut. Genes.

## 7.1 Introdução

O pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) é uma espécie arbórea, cultivada em diversas partes do mundo para a produção de biodiesel, porém, pouco se sabe sobre a diversidade genética da espécie (ROSADO et al., 2010). De acordo com Carels (2009), o gênero *Jatropha* é nativo da América tropical, onde os fósseis mais antigos foram encontrados no Peru. Como o pinhão manso é uma cultura oleaginosa, genes relacionados ao desenvolvimento dos frutos e sementes, incluindo aqueles associados à síntese de óleo e compostos tóxicos como ésteres de forbol, podem fornecer informações sobre a diversidade genética da espécie (CARELS, 2009).

Durante o desenvolvimento dos frutos e sementes, diversas vias metabólicas são ativadas para a produção de óleo, como a biossíntese de ácidos graxos (HARWOOD, 1996). As enzimas chave envolvidas neste processo são Acetyl-CoA Carboxylase (ACCase) e a Fatty Acid Synthase (FAS) (OHLROGGE; JAWORSKI, 1997). Outras vias metabólicas também estão envolvidas no desenvolvimento, acúmulo de compostos secundários e maturação dos frutos (GOMES et al., 2010).

Os genes associados à biossíntese de ácidos graxos e compostos tóxicos são altamente expressos nas sementes em desenvolvimento (VAN DE LOO et al., 1995; GOMES et al., 2010). Assim o emprego de Etiquetas de Sequências Expressas (ESTs) na identificação de cDNAs de enzimas envolvidas nessa via e na biossíntese de terpenóides, são favorecidos durante o desenvolvimento dos frutos (CAHOON; KINNEY, 2005; GOMES et al., 2010).

Marcadores moleculares são considerados ferramentas eficientes para compreender a diversidade genética existente entre e dentro de populações. No caso de pinhão manso, a diversidade genética foi analisada utilizando marcadores de DNA como *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP), *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD), *Inter-Simple sequence Repeat* (ISSR) e microssatélites (SSR) (GINWAL et al., 2004; BASHA; SUJATHA, 2007; KAUSHIK et al., 2007; RANADE et al., 2008; SUN et al., 2008; SUDHEER et al., 2009ab; ROSADO et al. 2010; SUDHEER PAMIDIMARRI et al., 2010; YAOWALAK et al., 2011). Não existem trabalhos descrevendo o uso do marcador *Target Region Amplification Polymorphism* (TRAP) para a espécie, além de existir poucas informações sobre a diversidade genética de genes ligados ao desenvolvimento de frutos e sementes.

O marcador TRAP avalia o polimorfismo próximo a regiões de genes candidatos, e deriva da amplificação empregando um iniciador fixo, desenhado a partir de uma sequência

expressa (EST) de um gene candidato, e um segundo iniciador arbitrário, formado por uma sequência rica em AT ou GC para anelar com um *intron* ou *exon*, amplificando as demais regiões prováveis do gene candidato (HU et al., 2005). A reação de amplificação produz fragmentos com aproximadamente 50 a 1000 pb, que devem ser separados por eletroforese em géis de poliacrilamida (HU; VICK, 2003). Esta técnica tem sido utilizada tendo como alvo genes que governam características agronômicas de interesse e apresenta algumas vantagens, como alta reprodutibilidade, simplicidade como a dos marcadores RAPD e capacidade de produzir padrão múltiplo de bandas semelhantes à técnica de AFLP (HU; VICK, 2003). Hu et al. (2005) e Simko e Hu (2008), ressaltam que essa técnica é útil para a genotipagem de coleções de germoplasma, como no caso da alface (*Lactuca sativa* L.), onde a diversidade genética foi estudada e a técnica TRAP foi eficiente para separar as cultivares, como também relacionar evolutivamente as espécies. A técnica TRAP tem sido aplicada com sucesso nos estudos de mapeamento do genoma do girassol (HU, 2006), de diversidade genética em populações de cana-de-açúcar (ALWALA et al., 2006) e de espinafre (HU et al., 2007).

O objetivo desse trabalho foi investigar a diversidade genética de populações de pinhão manso a partir de marcas específicas para genes envolvidos no desenvolvimento de frutos.

## **7.2 Material e Métodos**

### **7.2.1 Material Vegetal**

Foram analisados 345 acessos de 51 populações cultivadas com o intuito de amostrar a diversidade existente nos países como o Brasil, Camboja, China, Colômbia, México, República Dominicana e Tanzânia (Anexo A).

### **7.2.2 Extração e quantificação do DNA genômico**

A extração e quantificação do DNA são descritos com maiores detalhes no Capítulo 3, itens 3.2.3 e 3.2.5.

### 7.2.3 Marcadores Moleculares TRAPs

Os iniciadores fixos foram adaptados de sequências de EST-SSR obtidos a partir de uma biblioteca *full length* de cDNA, construída a partir de transcritos de semente de pinhão manso em três estágios de desenvolvimento anterior ao amadurecimento, como descrito por Gomes (2009) e Gomes et al. (2010). As sequências estão descritas na Tabela 7.1. Os iniciadores arbitrários foram escolhidos de acordo com Li e Quiros (2001), que utilizaram estas sequências no desenvolvimento de um marcador molecular denominado de *Sequence-Related Amplified Polymorphism* (SRAP) durante o mapeamento de genes em *Brassica* (Tabela 7.1).

Foram testados sete iniciadores fixos e três aleatórios, totalizando 21 combinações. As reações de amplificação foram realizadas em um volume final de 15 µL, contendo 25 ng de DNA; 10X tampão da *Taq* com KCl [500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl (pH 8,8 à 25°C), 0,8% (v/v) Nonidet P40]; 100 µM de cada dNTP, 3,7 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 µM de cada iniciador e 1 U de *Taq polymerase* (Fermentas Life Science). As amplificações foram conduzidas com desnaturação inicial 94°C por 2 min, 5 ciclos a 94°C por 45 s, 35°C por 45 s, 72°C por 1 min, seguido de 35 ciclos 94°C por 45 s, 50°C por 45 s, 72°C por 1 min e uma etapa de extensão de 72°C por 7 min de acordo com Hu e Vick (2003). Os fragmentos foram amplificados e analisados em gel de 7%, poliacrilamida corado com nitrato de prata (CRESTE et al., 2001).

### 7.2.4 Clonagem e sequenciamento do gene específico

Para elucidar e confirmar a presença e ausência de fragmentos detectados em todos os acessos tóxicos e atóxicos, durante a amplificação da combinação de iniciadores GeranylF e P5, procedeu-se a seleção da banda do gel, para a determinação da sequência nucleotídica de modo a averiguar a sequência do gene ligado a Geranyl Pirophosphatase Synthase (biossíntese de terpenóides), e que não foi encontrada nos acessos atóxicos mexicanos. Um fragmento de aproximadamente 383 pb presentes nos acessos tóxicos foram excisados e armazenados em tubos eppendorf contendo 50 µL 10X tampão da *Taq* com KCl e desnaturados a 94°C por 5 min. As bandas excisadas foram reamplificadas com os iniciadores GeranylF e P5 e os produtos foram confirmados em gel de 7% poliacrilamida, quantificados e posteriormente clonados e sequenciados conforme item 4.2.5, no Capítulo 4.

**Tabela 7.1** - Sequências de iniciadores fixos e arbitrários utilizados para amplificar marcadores TRAPs nos acessos de pinhão manso

Iniciadores	Nomenclatura	Sequência (5' → 3')	Anotação Funcional (GOMES et al., 2010)
Iniciadores fixos	JC001F	GAGATCACCTGCACTTGCTCC	Ketoacyl-ACP Reductase (Biossíntese de ácido graxo)
	JC007F	GGAAAAACACCAGATGTGCC	Actin 57B
	JC008F	AACACCAAACTTCCAAGAG	60Sribossomal protein L28
	JC009F	AGAGTGGCCCATTACGCAAGT	Early nodulin puntative
	JC010F	CGAGGTCTCACTTCTTCTTCC	Enoyl-CoA hydratase precursor (Metabolismo do ácido graxo insaturado)
	JC011F	AGATCGATTAGCAGTGGTCC	Proteína com função desconhecida
	GeranylF	GCACCACTTTTGTGAGGTT	Geranyl Pyrophosphate Synthase (Biossíntese de Terpenóide – Forbol)
Iniciadores arbitrários	P3	GACTGCGTACGAATTGAC	-
	P4	GACTGCGTACGAATTTGA	-
	P5	GACTGCGTACGAATTGCA	

### 7.2.5 Análises estatísticas

Para os fragmentos polimórficos amplificados pelo marcador TRAP, foi construída uma matriz binária, analisando-se a presença (1) ou ausência (0) de cada banda. O cálculo da diversidade genética foi realizado utilizando-se o índice de Shannon (1948), considerando cada banda polimórfica como um loco com dois alelos. O agrupamento UPGMA (método das médias das distâncias) foi obtido pelo índice de dissimilaridade com o auxílio do programa NTSYS-pc 2.02 (ROHLF, 1995) e a construção do dendrograma pelo programa MEGA5 (TAMURA et al., 2011). Os *bootstraps*, visando confirmar a consistência dos nós, foram realizados pelo programa estatístico BOODP (COELHO, 2002). Outro parâmetro analisado foi à análise de variância molecular (AMOVA), visando verificar como a diversidade genética está distribuída, com o auxílio do programa Arlequin (EXCOFFIER et al., 2005).

Os cromatogramas do seqüenciamento foram analisados quanto a qualidade e presença do vetor com o programa *Phred*, *Phrap* e *Consed* (<http://www.phrap.org/index.html>) e o alinhamento das sequências SP6 e T7 para cada clone foi realizado no programa CLUSTAL W - BioEdit (THOMPSON et al., 1994). A partir do alinhamento das sequências nos dois sentidos (SP6 e T7) foi gerada uma consenso para cada clone utilizando o programa BioEdit, e dos três clones para cada acesso obteve-se uma consenso final. A sequência consenso final foi comparada por BLASTn com o banco de dados do *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

## 7.3 Resultados e Discussão

### 7.3.1 Análise da diversidade

Os marcadores dominantes têm sido utilizados com sucesso para estudar a diversidade genética em muitas espécies de plantas superiores, incluindo membros da família Euphorbiaceae como a *Hevea brasiliensis* (LESPINASSE et al., 2000), *Manihot esculenta* (ELIAS et al., 2000) e pinhão manso (SUJATHA et al., 2005; SUDHEER PAMIDIMARRI et al., 2008; TATIKONDA et al., 2009).

Os marcadores TRAP foram inicialmente desenvolvidos para amostras de DNA de girassol (HU; VICK, 2003). Estes marcadores já foram empregados em diversas espécies tais como alface (*Lactuca sativa* L.; HU et al., 2005), trigo (*Triticum aestivum* L.; LIU et al.,

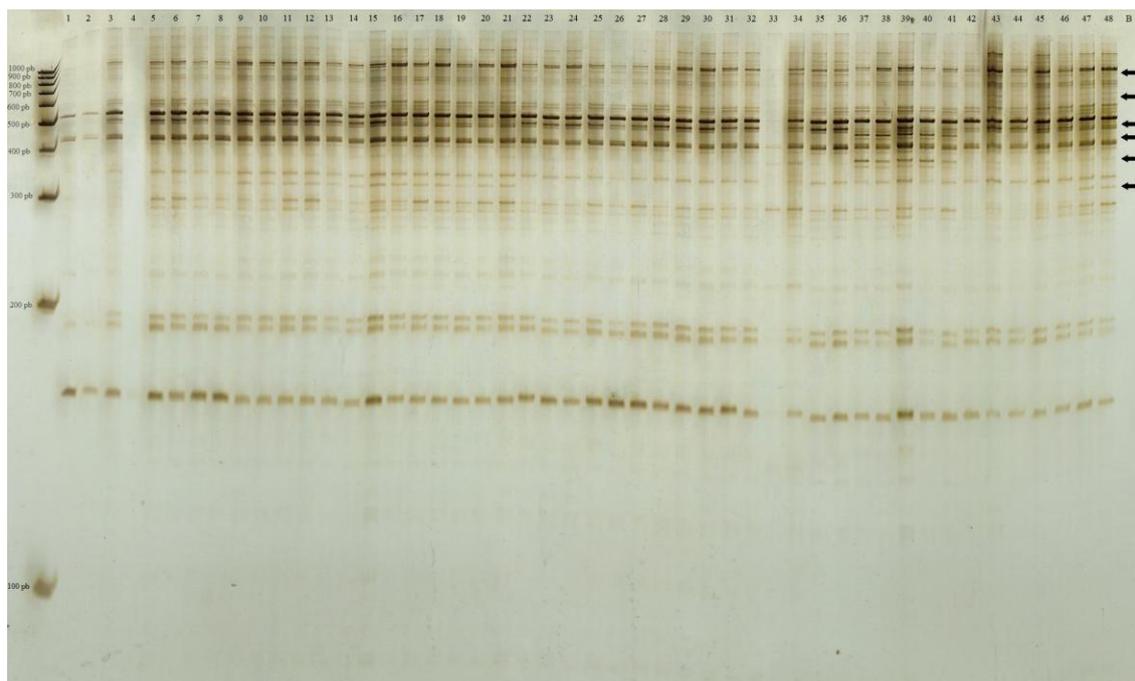
2005) e feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.; MIKLAS, et al., 2006), e para análises de *Quantitative Trait Locus* (QTLs), ligados a teor de óleo em *Brassica napus* L (JIN et al., 2007). Para o pinhão manso não há relatos de utilização do marcador TRAP. Gomes et al. (2010) identificaram 1.053 sequências de ESTs de alta qualidade relacionados ao desenvolvimento de frutos para pinhão manso. As ESTs anotadas foram associadas a 71 vias metabólicas distintas, dentre as quais, vale destacar a de biossíntese de ácidos graxos saturados e insaturados, biossíntese de terpenóides e metabolismo do ácido  $\alpha$ -Linolênico. A partir disso, foram escolhidos genes nessas vias para desenhar iniciadores específicos para o estudo dos genes relacionados às vias metabólicas de biossíntese de ácidos graxos e terpenóides (Tabela 7.1).

Vinte e uma combinações de iniciadores foram testadas, sendo sete fixos a partir de sequências *Expressed Sequence Tag* (EST) e três arbitrários baseados em *Sequence-Related Amplified Polymorphism* (SRAP), das quais treze geraram fragmentos polimórficos (Figuras 7.1, 7.2 e 7.3). O número total de fragmentos gerados foi 296 nas treze combinações, sendo 27,4% (81 fragmentos) polimórficos. O número de fragmentos polimórficos amplificados por combinação variou de 1 (GeranylF + P5) a 30 (JC011 + P3), e os fragmentos amplificados variaram de aproximadamente 100 a 1000 pares de base (pb). O número médio de 22,8 fragmentos/loco para pinhão manso foi similar ao encontrado por Hu et al. (2005) para alface, e inferior ao relatado por Hu e Vick (2003), que encontraram 50 fragmentos para girassol. Porém, outros estudos com pinhão manso utilizando marcadores dominantes, como no caso de Sudheer Pamidimarri et al. (2008), que utilizaram marcadores RAPD e AFLP para estudar acessos tóxicos e atóxicos. Os autores relatam ter encontrado 15% bandas polimórficas para RAPD e 16,5% para AFLP. Mesmo conseguindo caracterizar a toxicidade dos acessos, esses marcadores apresentaram baixo padrão de polimorfismo, quando comparado ao TRAP aqui descrito (27,4%). Tatikonda et al. (2009), avaliando 48 acessos de pinhão manso coletados em seis diferentes estados da Índia com sete combinações de iniciadores AFLP, encontraram 680 fragmentos polimórficos, dos quais 8,7% foram exclusivos e 16% raros, contudo os autores também relatam que muitos dos fragmentos polimórficos encontrados não foram informativos. Comparando o polimorfismo encontrado com os marcadores dominantes RAPD e AFLP para pinhão manso com os obtidos com o marcador TRAP, verificou-se que o último foi tão eficiente quanto os outros na detecção de fragmentos polimórficos. As treze combinações permitiram a separação das 51 populações. A diversidade genética total para cada uma das populações foi mensurada pelo Índice de diversidade de Shannon ( $I$ ) que varia de zero a 1. Quanto maior o valor de  $I$  maior será a diversidade. O  $I$  variou de zero a 0,16,

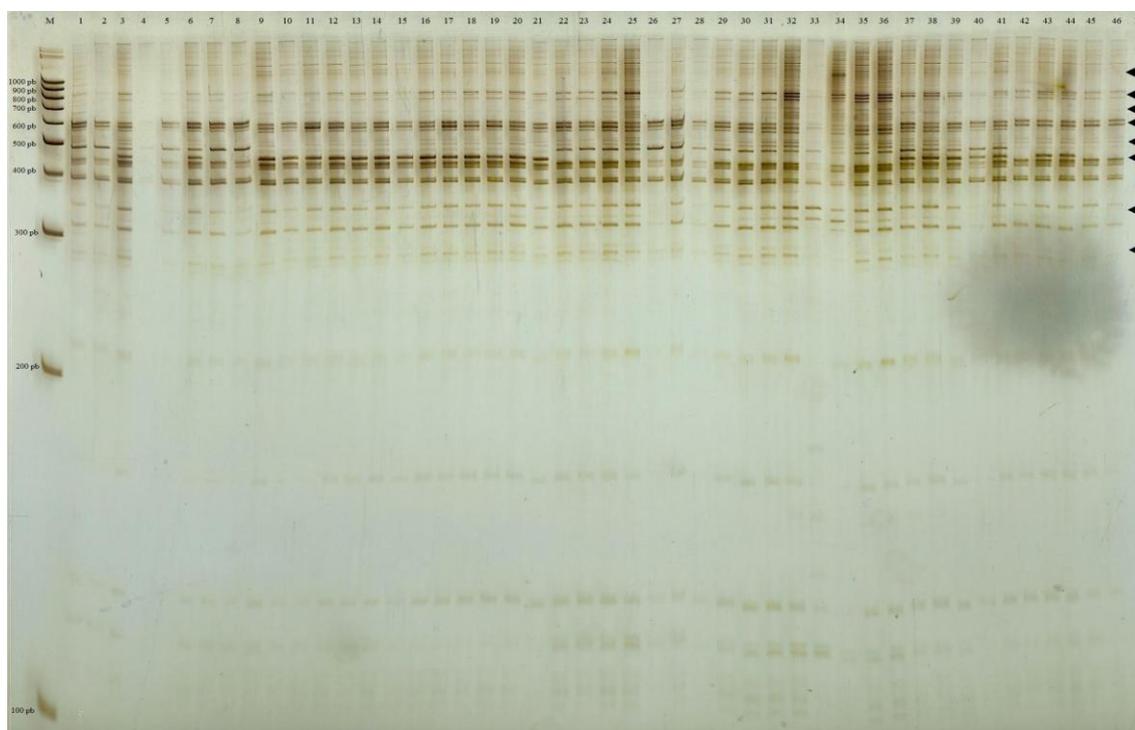
com um valor médio de 0,03, sendo o maior valor somente encontrado dentro da população 40 da Colômbia (Anexo D). De modo geral, os dados indicam a existência de pequena variabilidade genética dentro das populações. As maiores diversidades entre as populações foram encontradas na Colômbia (0,17), México (0,13) e Brasil (0,10) (Anexo D). No Brasil os maiores valores de diversidade foram encontrados nos Estados de São Paulo (0,12), Minas Gerais (0,08) e Goiás (0,07) (Anexo D). O maior *I* observado de São Paulo pode ser explicado devido à introdução de materiais de Minas Gerais e Mato Grosso do Sul nas principais áreas de cultivo (Anexo D). De maneira geral, o *I* observado tanto dentro das populações como entre elas, foi baixo, indicando pequena diversidade para os caracteres associados ao desenvolvimento das sementes (Anexo D).

A distribuição da diversidade genética foi estudada por meio da análise de variância molecular (AMOVA), com base em 81 locos polimórficos, nos diferentes níveis hierárquicos: (I) populações em geral, (II) América versus demais países, e (III) populações do Brasil, com base na amplificação de oito locos microssatélites (Tabela 7.3). Os resultados revelaram que a maior variação genética foi encontrada entre as populações (92%), enquanto que a variação dentro das populações foi de 8% (Tabela 7.2). Comparando-se a América com a África e sudeste asiático, a maior parte da diversidade foi observada entre as populações (77,3%), quando comparada entre as regiões (15,1%). Esses resultados indicam que o centro de diversidade da espécie encontra-se na América e que o isolamento reprodutivo não contribuiu para o aumento da distância entre as populações cultivadas na África e no Sudeste Asiático. No Brasil a maior parte da diversidade foi encontrada entre populações (45,3%), porém entre os estados a diversidade foi de 17%. Todos os componentes de variância foram altamente significativos ( $P < 0,001$ ), sendo assim, cada população mantém uma considerável variação genética quando comparada à outra, como também dentro de regiões (Tabela 7.2).

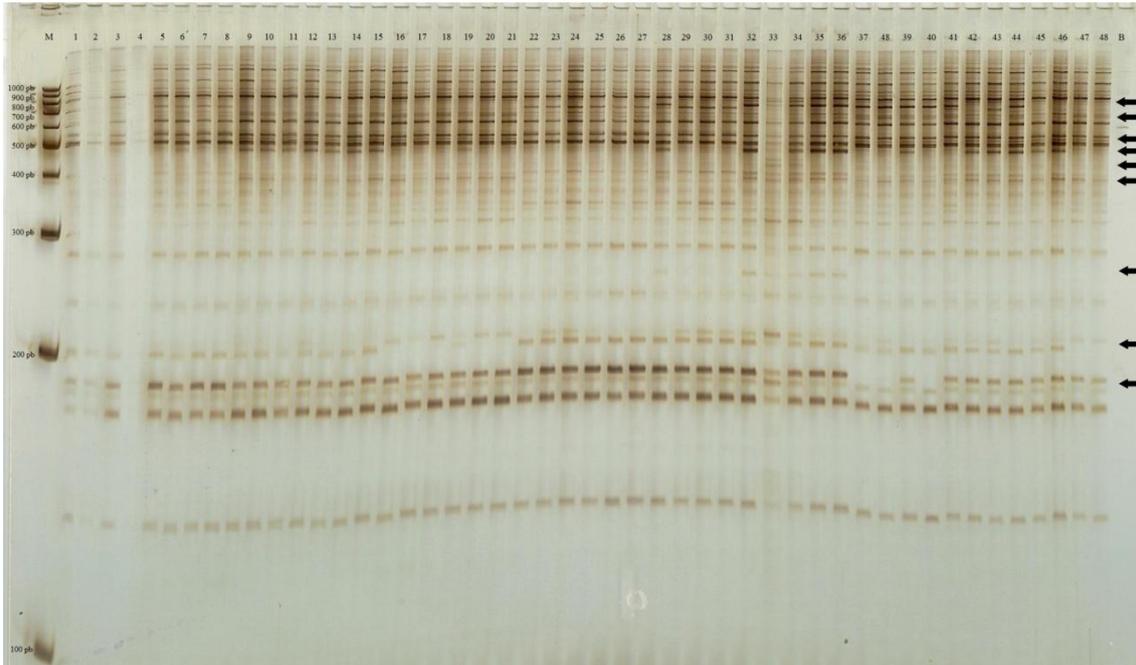
Os resultados obtidos com o *I* e AMOVA reforçam a hipótese de que o centro de diversidade do pinhão manso está localizado na América. Outros grupos, como Jiménez e Martinez (1994), Heller (1996), Openshaw (2000), Ginwal et al. (2004), Kumar et al. (2009), Sudheer Pamidimarri et al. (2009a), propuseram que o centro de diversidade do pinhão manso poderia ser a Mesoamérica (México e América Central), pois esta região concentrava 100 das 175 espécies de *Jatropha* analisadas. Além disso, no México existem 41 espécies nativas, das quais 31 são endêmicas. Diferentemente, Arruda et al. (2004), Melo et al. (2006), Basha et al. (2009), Sudheer et al. (2009b; 2010), defendem a hipótese de que a planta é nativa da América do Sul.



**Figura 7.1** - Perfil de amplificação gerado pelo marcador TRAP (JC001F + P4). M: marcador 100 pb; Acessos: 1 a 8 – República Dominicana; 9 a 15– Brasil (Lins); 16 a 21 – Brasil (Holambra); 22 a 26 – Colômbia (CPM6); 27 a 31 – Colômbia (SPS13A); 32 a 36 – China (var. 1); 37 a 41 – México, (Pigneia); 42 a 48 – Camboja (1); B: branco



**Figura 7.2** - Padrão de amplificação gerado pelo marcador TRAP (JC010F + P3). M: marcador 100 pb; Acessos (1 a 8 – República Dominicana; 9 a 15– Brasil (1); 16 a 21 – Brasil (2); 22 a 26 – Colômbia (1); 27 a 31 – Colômbia (2); 32 a 36 – China; 37 a 41 – México, var. 2; 42 a 48 – Camboja); B: branco



**Figura 7.3** - Padrão de amplificação gerado pelo marcador TRAP (JC011F + P3). M: marcador 100 pb; Acessos (1 a 8 – República Dominicana; 9 a 15– Brasil (1); 16 a 21 – Brasil (2); 22 a 26 – Colômbia (1); 27 a 31 – Colômbia (2); 32 a 36 – China; 37 a 41 – México, var. 2; 42 a 48 – Camboja); B: branco

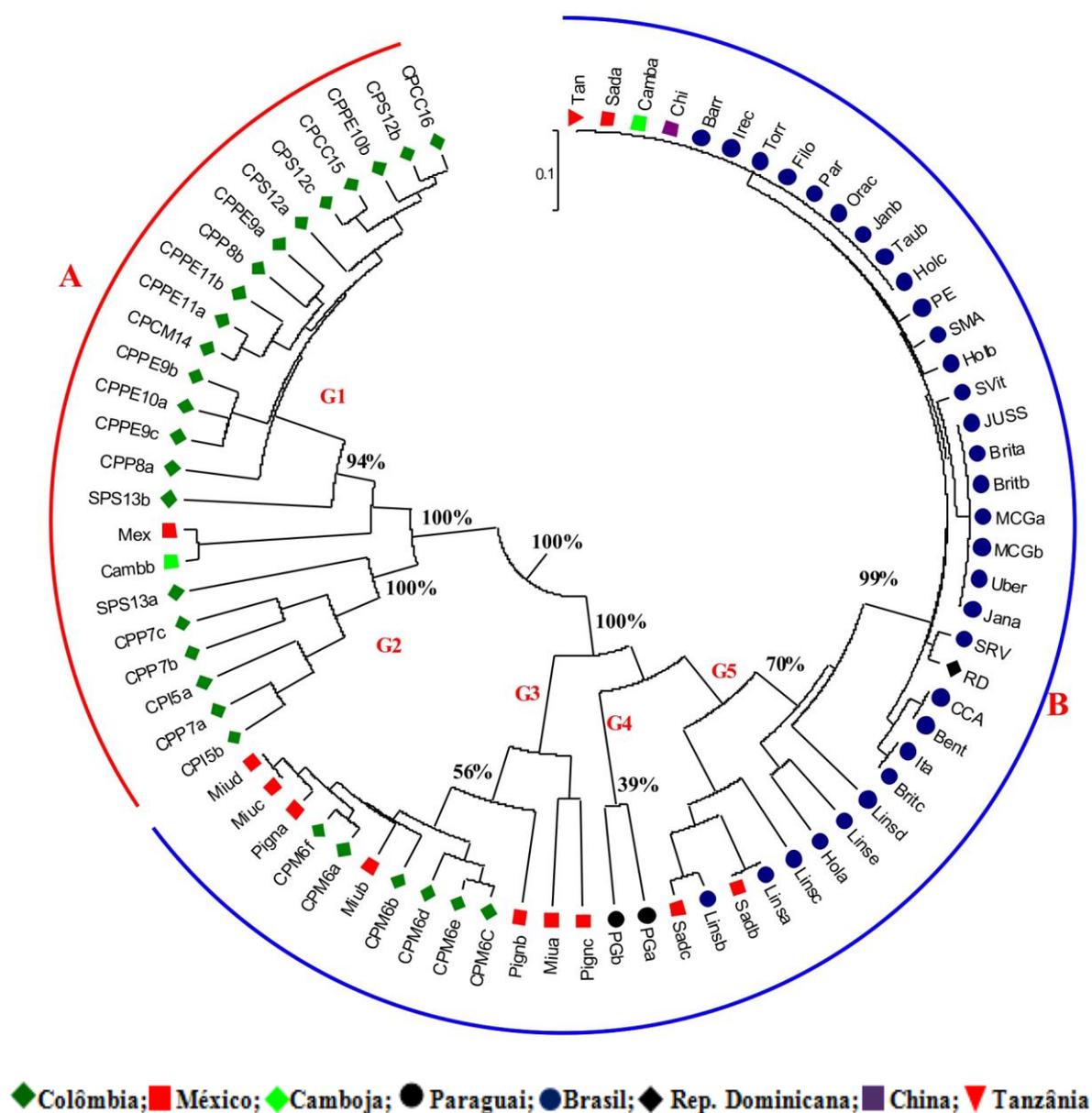
**Tabela 7.2** - Resultados da análise de variância molecular (AMOVA) considerando a distribuição da diversidade entre e dentro de populações em três níveis hierárquicos: (I) populações em geral, (II) América versus demais países, e (III) populações do Brasil, com base na amplificação de 81 fragmentos do marcador TRAP

Fonte de variação	F <sub>ST</sub>	GL	SQ	% variação total	Valor de P <sup>I</sup>
<b>I</b>	0,91				
Entre populações		50	3370,1	91,6	0,000
Dentro de populações		344	273,8	8,3	0,000
<b>II</b>	0,93				
Entre regiões		1	219,9	15,1	0,000
Entre populações dentro de regiões		49	3150,2	77,3	0,000
Dentro de regiões		294	263,7	7,36	0,000
<b>III</b>	0,53				
Entre populações		25	126,8	53,4	0,000
Dentro de populações		144	86,2	46,6	0,000

<sup>I</sup> número de permutações = 1000; F<sub>ST</sub>, índice de fixação de Wright

O dendograma revela a distribuição das populações em dois grandes grupos significativos (100% de confiabilidade, com base *nos bootstraps*): A e B, demonstrando uma associação entre a diversidade e a origem geográfica de cada uma delas (Figura 7.4). O grupo A foi dividido significativamente em dois *clusters* (G1 e G2). O *cluster* G1 é constituído basicamente por populações colombianas (CPCC16, CPS12, CPPE10, CPCC15, CPP8, CPPE11, CPC14, CPPE9 e SPS13), uma população do México (Mex) e uma do Camboja (Cambb) (Figura 7.4). O segundo *cluster* (G2) é composto pelas populações colombianas SPS13, CPP7, CPI5 e CPP7 (Figura 7.4). O grupo B foi dividido em três *clusters* arbitrários (G3, G4 e G5). O *cluster* G3 contém as populações do México (Miúda - Miu e Pigneia - Pign) e a população colombiana (CPM6); o *Cluster* G4 contém as populações do Paraguai (PGA e PGB); e no *Cluster* G5 engloba todas as populações do Brasil, além das populações do México (SadB e Sad), República Dominicana (RD), Tanzânia (Tan), Camboja (Camba) e todas as populações da China (Chi), agrupadas como uma única população devido as similaridades entre elas (Figura 7.4).

O perfil dos agrupamentos principais e secundários apresentados revela a existência de diversidade genética entre as populações de pinhão manso mantidas no banco de germoplasma da UFSCar. A utilização de marcadores dominantes para estudo de diversidade em pinhão manso tem sido amplamente relatada. Sujatha et al. (2005) utilizaram marcadores RAPD para determinar o índice de similaridade entre acessos indianos e genótipos atóxicos mexicanos. Os autores utilizaram 95 iniciadores que geraram 435 bandas, separando os acessos em dois grupos com 96% de similaridade. Os marcadores ISSR foram utilizados por Hartmann-Neto et al. (2006) para avaliar acessos de pinhão manso da região Centro-Norte do Brasil e encontraram níveis consideráveis de polimorfismo. Oliveira et al. (2007) estudando acessos brasileiros de Minas Gerais, Goiás, Espírito Santo e Sergipe com o marcador RAPD encontraram grande diversidade genética entre as regiões. Da mesma forma, Taticonda et al. (2009), utilizando marcador AFLP, relataram grande diversidade entre acessos de pinhão manso de seis Estados da Índia.



**Figura 7.4** – Parentesco entre 51 populações de pinhão manso. Dendrograma gerado a partir do agrupamento UPGMA obtido pelo índice de dissimilaridade de Jaccard, calculado a partir de um conjunto de resultados do marcador TRAP. A estabilidade dos nós foi testada com um procedimento de 1000 bootstraps

Diferentemente, alguns trabalhos relatam baixos níveis de diversidade e estreita base genética entre acessos de pinhão manso (SUJATHA et al., 2005; BASHA; SUJATHA, 2007; SUN et al., 2008; SUDHEER PAMIDIMARRI et al. 2009a). Sun et al. (2008) avaliaram a diversidade genética de 56 acessos de pinhão manso chineses e dois da Malásia, por marcadores microssatélites e AFLP. Somente um loco microssatélite apresentou polimorfismo

e dos 70 fragmentos gerados pela técnica AFLP, apenas 14% foram polimórficos. Similarmente, Montes-Osório et al. (2008), utilizando a técnica de AFLP, encontraram baixa diversidade entre genótipos de origem africana e asiática.

Dessa forma, a desuniformidade dos resultados apresentados sobre a diversidade genética entre os acessos de pinhão manso certamente deve estar relacionada ao tipo de marcador utilizado (Ovando-Medina et al. 2011) e os acessos avaliados. Além disso, pode-se destacar também o número baixo de introduções e as técnicas de manutenção das plantas via propagação vegetativa, como fatores que podem influenciar negativamente nos estudos de diversidade genética da espécie (BASHA; SUJATHA, 2007).

### 7.3.2 Sequenciamento do gene específico

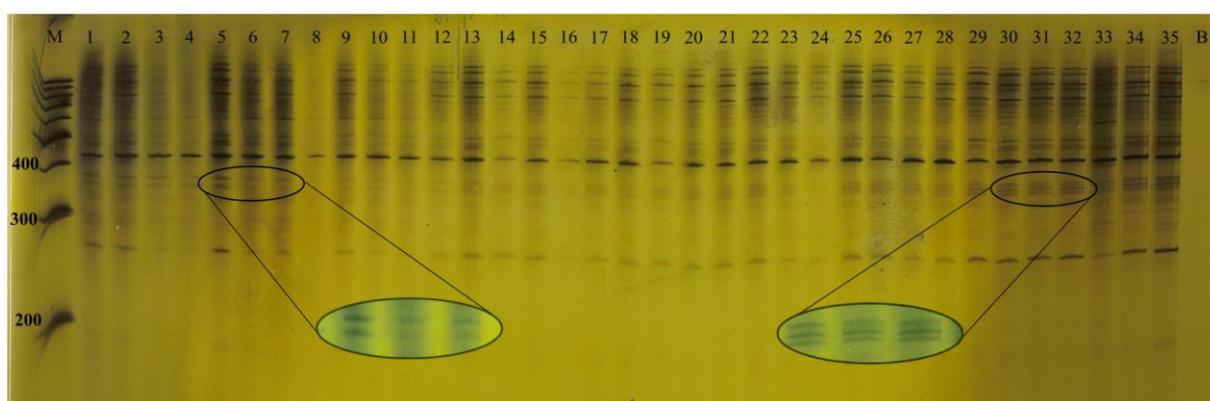
Genes ligados a biossíntese de terpenos em *Jatropha* tem atraído a atenção de muitos pesquisadores (GOMES et al., 2010; LIN et al., 2010; SATO et al., 2011) devido a presença de ésteres de forbol na parte aérea planta, em especial nas sementes das espécies do gênero. Os terpenos formam uma diversificada classe de substâncias naturais, ou metabólitos secundários tóxicos para a maioria dos vertebrados e invertebrados, e estão distribuídos pelas famílias Euphorbiaceae e Thymelaeaceae (EVANS; EDWARDS, 1987; LIN et al., 2010).

Os ésteres de forbol são uma complexa mistura de diterpenos tetracíclicos, responsáveis pela ação alérgica de algumas plantas (EVANS; EDWARDS, 1987), presentes nos resíduos das sementes (torta) do pinhão manso, o que acaba por restringir seu uso na alimentação animal, pois esses metabólitos secundários podem agir de forma aguda (inflamação intensa) ou crônica (indução de tumor) no organismo (MAKKAR et al., 1997).

Outro problema é lipossolubilidade dos ésteres de forbol, ou seja, grande parte dos mesmos são extraídos juntamente com o óleo, restringindo assim o consumo humano (GONÇALVES et al., 2009). Por outro lado, os terpenóides são componentes ativos de defesa das plantas e sua eliminação poderia aumentar os problemas com pragas e doenças (GOMES et al., 2010). Desta forma, métodos para suprimir ou inativar os genes responsáveis pela biossíntese dos terpenos em pinhão manso têm sido motivo de vários estudos (MAKKAR et al., 1997; MAKKAR; BECKER, 2009; LIN et al., 2010; MAKKAR et al., 2011; SATO et al., 2011).

Um dos genes associados a biossíntese de terpenos no gênero *Jatropha* é o Geranyl Pyrophosphate Synthase (GPPS, EC: 2.5.1.30), que é uma cadeia homodimérica responsável

pela síntese da Geranylgeranyl Diphosphate (GGPP) (SATO et al., 2011). O conhecimento do papel deste gene em pinhão manso pode potencialmente auxiliar na manipulação genética, como também nos programas de melhoramento genético da espécie (LIN et al., 2010). Diante disso, a busca de variabilidade genética torna-se relevante para níveis de ésteres de forbol no pinhão manso. No México, são encontrados acessos de pinhão manso e outras espécies gênero como a *J. platyphylla* que não são tóxicas, devido a ausência dos ésteres de forbol e fazem parte da alimentação dos nativos (MAKKAR; BECKER, 2009; MAKKAR et al., 2011). Sujatha et al. (2005) e Sudheer Pamidimarri et al. (2009a) identificaram marcas moleculares para separação de acessos tóxicos de atóxicos mexicanos. De forma geral, os trabalhos realizados relatam o desenvolvimento de marcas que podem ser utilizadas somente para a separação dos acessos. Entretanto, nossos esforços foram concentrados para encontrar um marcador diretamente relacionado com a via de biossíntese dos terpenóides. A partir disso, foram desenhados iniciadores específicos para o gene ligado a GPPS (GOMES et al., 2010), que codifica a enzima chave da biossíntese dos ésteres de forbol nas sementes do pinhão manso (LIN et al., 2010; SATO et al., 2011). Desta forma, o iniciador GeranylF foi desenhado e a combinação com o iniciador fixo P5 promoveu a separação dos acessos tóxicos dos atóxicos, pela ausência de um fragmento de aproximadamente 383 pb nas populações mexicanas (Figura 7.5).



**Figura 7.5** - Padrão de amplificação gerado pelo marcador TRAP (GeranylF + P5). M: marcador 100 pb; Acessos (1 a 13 – acessos mexicanos; 14 a 21 – acessos brasileiros; 22 a 29 – acessos colombianos; 30 a 31 – acessos chineses; 32 e 33 acessos paraguaios; 34 acesso do Camboja; 35 acesso da Tanzânia; B: branco

O sequenciamento do fragmento amplificado pelo marcador TRAP nos acessos tóxicos, visa aprofundar os conhecimentos sobre o que pode ter contribuído para a supressão deste fragmento nas populações mexicanas. Desta forma, seis acessos tóxicos tiveram seus

fragmentos excisados, amplificados, clonados no vetor pGEM-T, amplificados novamente utilizando iniciadores universais SP6 e T7 e sequenciados. O sequenciamento foi realizado em ambos os lados da fita de DNA de todos os clones, efetuando a comparação entre as sequências ‘forward’ e ‘reverse’. A análise de todas as sequências geradas produziu uma sequência consenso de 355 pb (Figura 7.6). Esta sequência consenso foi comparada com as depositadas no GenBank e apresentou homologia de 91% com clone BAC (gi/317106716/dbj/AP0111971.1) inserido no banco de dados por Sato et al. (2011), onde estão localizados três genes relacionados a via de biossíntese de terpenos, porém a sequência relatada fica fora das regiões gênicas. Nossos resultados certamente levam a investigações futuras sobre os processos evolucionários que podem ter contribuído para a supressão desta sequência nas populações mexicanas atóxicas.

**GACTGCGTACGAATTAAC**AGTTTGGGTCTAATTGAAAAATCTCCTTTCACATAC  
 ATTCAAATGATGAGGTATATTCCAACCTAGCGGATGGGACCCTTACCAATCCAC  
 CAAAAGCATGTAATGACCTTAGAATCGATCCCTAGGATTATATGCACCCAAAATC  
 ATGAAATGATTTCAACATGACATCCACGCATTCAAGCATTTCACGTCATAGAGAA  
 GTAACCTAAACACTATACCTATGGTTCAACCTAAACCCATGGTCAACCTAAACAC  
 CAACCAGTGGGCAACCTAAACACCCACCAGNTAGTCAAACCTAAACACCAACCA  
 GTGGTCAA**ACCTCAACAAAAGTGGTGC**

**Figura 7.6** – Sequências nucleotídicas obtidas a partir do fragmento presente nos acessos tóxicos e ausente nos atóxicos; Sequência em vermelho corresponde ao iniciador P5; Sequência em azul corresponde ao iniciador GeranylF

#### 7.4 Conclusões

O marcador molecular TRAP foi eficiente para a caracterização da diversidade genética das populações de pinhão manso. A maior parte da variabilidade genética foi encontrada nas populações da Colômbia, México e Brasil. As populações mexicanas não apresentaram parte da sequência do gene Geranyl Pyrophosphate Synthase, enzima chave da biossíntese dos ésteres de forbol.

## Referências

- ALWALA, S.; SUAN, A.; ARRO, J. A.; VEREMIS, J. C.; KIMBENG, C. A. Target region amplification polymorphism (TRAP) for assessing genetic diversity in sugarcane germplasm collections. **Crop Science**, Madison, v. 46, p. 448-455, 2006.
- ARRUDA, F. P.; BELTRÃO, N. E.; ANDRADE, A. P.; PEREIRA, W. E.; SEVERINO, L. V. Cultivo de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) como alternativa para o semi-árido nordestino. **Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibrosas**, Campina Grande, v. 8, p. 789-799, 2004.
- BASHA, S. D.; SUJATHA, M. Inter and intra-population variability *Jatropha curcas* characterized by RAPD and ISSR markers and development of population-specific SCAR markers. **Euphytica**, Wageningen, v. 156, n. 3, p. 375-386, 2007.
- BASHA, S. D.; GEORGE, F.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K.; SUJATHA, M. A comparative study of biochemical traits and molecular markers for assessment of genetic relationships between *Jatropha curcas* L. germplasm from different countries. **Plant Science**, Amsterdam, v. 176, p. 812-823, 2009.
- CAHOON, E. B.; KINNEY, A. J. The production of vegetable oils with novel properties: using genomic tools to probe and manipulate plant fatty acid metabolism. **European Journal of Lipid Science and Technology**, Weinheim, v. 107, p. 239-243, 2005.
- CARELS, N. *Jatropha curcas*: a review. **Advances in Botanical Research**, London, v. 50, p. 40-86, 2009.
- COELHO, A. S. G. **BoodP**: avaliação dos erros associados a estimativas de distância/similaridades genéticas através do procedimento de bootstrap com um número variável de marcadores (software). Gioânia: UFG; Instituto de Ciências Biológicas; Laboratório de Genética Vegetal, 2002.
- CRESTE, S.; TULMANN-NETO, A.; FIGUEIRA, A. A detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology Reporter**, Heidelberg, v. 19, p. 299-306, 2001.
- EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. Arlequin version 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary Bioinformatics Online**, Bethesda, v. 1, p. 47-50, 2005.
- ELIAS, M.; PANAUD, O.; ROBERT, T. Assessment of genetic variability in a tradicional cassava (*Manihot esculenta* Crantz) farming system, using AFLP markers. **Heredity**, London, v. 85, p. 219-231, 2000.
- EVANS, F. J.; EDWARDS, M. C. Activity correlations in the phorbol ester series. **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v. 94, n. 1-2, p. 231-246, 1987.

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

GOMES, K. A. **Identificação de genes envolvidos na biossíntese de ácidos graxos e desenvolvimento de marcadores microssatélites no pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) visando sua utilização na produção de biodiesel**. 2009. 85 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, 2009.

GOMES, K. A.; ALMEIDA, T. C.; GESTEIRA, A. S.; LÔBO, I. P.; GUIMARÃES, A. C. R.; MIRANDA, A. B.; SLUYS, M. A. V.; CRUZ, R. S.; CASCARDO, J. C. M.; CARELS, N. ESTs from seeds to assist the selective breeding of *Jatropha curcas* L. for oil and active compounds. **Genomics Insights**, London, v. 3, p. 29-56, 2010.

GONÇALVES, S. B.; MENDONÇA, S.; LAVIOLA, B. G. **Substâncias tóxicas, alergênicas e antinutricionais presentes no pinhão manso e seus derivados e procedimentos adequados ao manuseio**. Brasília, DF: Embrapa Agroenergia, 2009. 5 p. (Circular Técnica, 1).

HARTMANN-NETO, I. R.; ALENCAR, J. L. M.; DINIZ, F. M.; SOUZA, V. A.; ARAUJO, E. C. E.; LIMA, P. S. C. Seleção de primers para uso de ISSR na análise da diversidade genética em pinhão manso (*Jatropha curcas* L.). In: CONGRESSO INTERNACIONAL DE AGROENERGIA E BIOCMBUSTÍVEIS, 1., 2007, Teresina. **Energia de resultados: palestras e resumos**. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2007. 1 CD-ROM. (Documentos, 143).

HARWOOD, J. L. Recent advances in the biosynthesis of plant fatty acids. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1301, p. 7-56, 1996.

HELLER, J. **Physic nut, *Jatropha curcas* L.:** promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. Rome; International Plant Genetic Resource Institute, 1996. 66 p.

HU, J.; VICK, B. A. Target Region Amplification Polymorphism: A Novel Marker Technique for Plant Genotyping. **Plant Molecular Biology Reporter**, Heidelberg, v. 21, p. 289-294, 2003.

HU, J.; SEILER, G. J.; JAN, C. C.; VICK, B. A. Assessing genetic variability among sixteen perennial *Helianthus* species using PCR-based TRAP markers. In: SUNFLOWER RESEARCH FORUM, 25., 2005, Fargo, ND. **Proceedings...** Disponível em: <http://sunflowerusa.com/research/research-workshop/documents/88.pdf>. Acesso em: 21 nov. 2005.

HU, J.; OCHOA, O. E.; TRUCO, M. J.; VICK, B. A. Application of the TRAP technique to lettuce (*Lactuca sativa* L.) genotyping. **Euphytica**, Wageningen, v. 144, p. 225-235, 2005.

HU J. Defining the sunflower (*Helianthus annuus* L.) linkage group ends with the *Arabidopsis* –type telomere sequence repeat-derive markers. **Chromosome research**, v. 14, p. 535-548, 2006.

HU, J.; MOU B.; VICK, B. A. Genetic diversity of 38 spinach (*Spinacia oleracea* L.) germplasm accessions and 10 commercial hybrids assessed by TRAP markers. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v. 54, p. 1667-1674, 2007.

JIMÉNEZ, R. J.; MARTÍNEZ, M. Redescripción de *Jatropha andrieuxii* Muell. Arg. (Euphorbiaceae), uma espécie endêmica Del Sur de México. **Acta Botánica Mexicana**, México, DF, n. 26, p. 27-32, 1994.

JIN, M.; LI, J.; FU, F.; ZHANG, Z.; ZHANG, X.; LIU, L. QTL analysis of the oil content and the hull content *Brassica napus* L. **Agricultural Sciences in China**, Beijing, v. 6, p. 414-421, 2007.

KAUSHIK, N.; KUMAR, K.; KUMAR, S.; KAUSHIK, N.; ROY, S. Genetic variability and divergence studies in seed traits and oil content of *Jatropha* (*Jatropha curcas* L.) accessions. **Biomass and Bioenergy**, Amsterdam, v. 31, p. 497-502, 2007.

KUMAR, R. V.; TRIPATHI, Y. K.; SHUKLA, P.; AHLAWAT, S. P.; GUPTA, V. K. Genetic diversity and relationships among germplasm of *Jatropha curcas* L. revealed by RAPDs. **Trees – Structure and Function**, Heidelberg, v. 23, n. 5, p. 1075 – 1079, 2009.

LESPINASSE, D.; ROIDER-GOUD, M.; GRIVET, L.; LECONTE, A.; LEGNATE, H.; SEGUIN, M. A saturated genetic linkage map of rubber tree (*Hevea* spp.) bases on RFLP, AFLP, microsatellite and isozyme markers. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 100, p. 127-138, 2000.

LI, G.; QUIROS, C. F. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in *Brassica*. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 103, p. 455-461, 2001.

LIN, J.; JIN, Y. J.; ZHOU, X.; WANG, J. Y. Molecular cloning and functional analysis of the gene encoding geranylgeranyl diphosphate synthase from *J. curcas*. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 9, p. 3342-3351, 2010.

LIU, Z. H.; ANDERSON, J. A.; HU, J.; FRIESEN, T. L.; RASMUSSEN, J. B.; FARIS, J. D. A wheat intervarietal genetic linkage map based on microsatellite and target region amplified polymorphism markers and its utility for detecting quantitative trait *loci*. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 111, p. 782-794, 2005.

MAKKAR, H.P.S.; BECKER, K.; SPORE, F.; WINK, M. Studies on nutritive potential and toxic constituents of different provenances of *Jatropha curcas*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 45, p. 3152-3157, 1997.

MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. *Jatropha curcas*, a promising crop for the generation of biodiesel and value-added coproducts. **European Journal of Lipid Science and Technology**, Weinheim, v. 111, p. 773-787, 2009.

MAKKAR, H. P. S.; KUMAR, V.; OYELEYE, O. O.; AKINLEYE, A. O.; ANGULO-ESCALANTE, M. A.; BECKER, K. *Jatropha platyphyla*, a new non-toxic *Jatropha* species: Physical properties and chemical constituents including toxic and antinutritional factors of seed. **Food Chemistry**, Barking, v. 125, p. 63-71, 2011.

MELO, J. C.; BRANDER, W.; CAMPOS, R.; PACHECO, J.; SCHULER, A.; STRAGEVITCH, L. Avaliação preliminar do Potencial do pinhão manso para a produção de biodiesel. In: CONGRESSO DA REDE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE BIODIESEL, 1., 2006, Brasília, DF. **Anais...** Brasília, DF: MCT, ABIPTI, 2006. p. 198-203.

MIKLAS, P. N.; HU, J.; GRÜNWARD, N. J.; LARSEN, K. M. Potential application of TRAP (Targeted Region Amplified Polymorphism) markers for mapping and tagging disease resistance traits in common bean. **Crop Science**, Madison, v. 46, p. 910-916, 2006.

MONTES-OSORIO, L.; VAN LOO, R.; JONGSCHAAP, R.; VISSER, R.; AZURDIA-JUNE, C. A to Z of *Jatropha curcas* L. 4. Genetics, breeding and propagation techniques. Plant Research International. Wageningen: Wageningen University, 2008. 33 p. Disponível em: [www.pri.wur.nl/NR/rdonlyres/90AF26A147D54F2F9E96D413C2933685/70110/JatrophaWorld20084Genetics.pdf](http://www.pri.wur.nl/NR/rdonlyres/90AF26A147D54F2F9E96D413C2933685/70110/JatrophaWorld20084Genetics.pdf).

OHLROGGE, J.; JAWORSKI, J. G. Regulation of fattyacid synthesis. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 48, p. 109-136, 1997.

OLIVEIRA, A. S.; SILVA-MANN, R.; SANTOS, M. F.; GOIS, I. B.; CARVALHO, S. V.; BOARI, A. J.; FRAGA, A. C.; CASTRO-NETO, P. Prospecção e caracterização de acessos de *Jatropha* sp. In: CONGRESSO INTERNACIONAL DE AGROENERGIA E BIOCOMBUSTÍVEIS, 1., 2007, Teresina. **Energia de resultados**; palestras e resumos. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2007. 1 CD-ROM. (Documentos, 143).

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

OVANDO-MEDINA, I.; ESPINOSA-GARCÍA, F. J.; NÚÑEZ-FARFÁN, J. S.; SALVADOR-FIGUEROA, M. State of the art of genetic diversity research in *Jatropha curcas*. **Scientific Research and Essays**, Victoria Island, Lagos, v. 6, n. 8, p. 1709-1719, 2011.

RANADE, S. A.; SRIVASTAVA, A. P.; RANA, T. S.; SRIVASTAVA, J.; TULI, R. Easy assessment of diversity in *Jatropha curcas* L. plants using two single-primer amplification reaction (SPAR) methods. **Biomass and Bioenergy**, Amsterdam, v. 32, p. 533-540, 2008.

ROHLF, F. J. **NTSYS-pc2.02**: numerical taxonomy and multivariate analysis system. New York: Exeter Software, 1995.

ROSADO, T. B.; LAVIOLA, B. G.; FARIA, D. A.; PAPPAS, M. R.; BHERING, L. L.; QUIRINO, B.; GRATTAPAGLIA, D. Molecular markers reveal limited genetic diversity in a large germplasm collection of the biofuel crop *Jatropha curcas* L. in Brazil. **Crop Science**, Madison, v. 50, p. 2372-2382, 2010.

SATO, S.; HIRAKAWA, H.; ISOBE, S.; FUKAI, E.; WATANABE, A. et al. Sequence analysis of the genome of an oil-bearing tree, *Jatropha curcas* L. **DNA Research**, Tokyo, v. 18, p. 65-76, 2011.

SHANNON, C. E. A mathematical theory of communication. **Bell System Thecnicae Journal**, Paris, v. 27, p. 379-423, 1948.

SIMKO, I., HU, J. Populations structure in cultivated lettuce (*Lactuca sativa* L.). **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Geneva, v. 133, p. 61-68, 2008.

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

SUDHEER PAMIDIMARRI, 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, p. 1357-1364, 2009a.

SUDHEER, D. V. N. P.; NIRALI, P.; REDDY, M. P.; RADHAKRISHNAN, T. Comparative study of interspecific genetic divergence and phylogenic analysis of genus *Jatropha* by RAPD and AFLP. **Molecular Biology Reports**, Dordrecht, v. 36, p. 901-907, 2009b.

SUDHEER PAMIDIMARRI, D. V. N.; MASTAN, S. G.; RAHMAN, H.; RAVI PRAKASH, C.; SINGH, S.; REDDY, M. P. Cross species amplification ability of novel microsatellites isolated from *Jatropha curcas* and genetic relationship with sister taxa. **Molecular Biology Reports**, Dordrecht, v. 38, p. 1383-1388, 2010.

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 Regulation**, Dordrecht, v. 47, p. 83-90, 2005.

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

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. Mega5: Molecular evolutionary, genetic analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 28, n. 10, 2731-2739, 2011. doi: 10.1093/molbev/msr121.

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

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, London, v. 22, p. 4673-4680, 1994.

VAN DE LOO, F. J.; BROUN, P.; TURNER, S. An oleate 12 hydroxylase from *Ricinus communis* L. is a fatty acyl desaturase homolog. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v. 92, p. 6743-6747, 1995.

YAOWALAK, N.; ARUNEE, W.; THITAPORN, P.; NONGLUCK, K.; RUNGSARID, K.; TANEE, R.; CHALERMPOL, P. Genetic diversity of physic nut (*Jatropha curcas* L.) revealed by SSR markers. **Journal Crop Science Biotechnology**, Heidelberg, v. 14, p. 105-110, 2011.

## 2. *Jatropha curcas* L. EXIBE UM SISTEMA MISTO DE REPRODUÇÃO, ALTA TAXA DE CRUZAMENTOS CORRELACIONADOS E APOMIXIA

### Resumo

O sistema hierárquico de reprodução entre e dentro de frutos foi estudado em uma população base de *Jatropha curcas*, utilizando-se seis locos microssatélites, com base nos modelos de cruzamentos mistos e cruzamentos correlacionados. Sementes de polinização aberta foram coletadas de 15 árvores matrizes, sendo amostrados sete frutos por planta, fornecendo 21 sementes. Desvios de cruzamentos aleatórios foram evidenciados pela média da taxa de cruzamento multiloco ( $t_m = 0,603$ ), indicando que a espécie tem um sistema misto de reprodução. A taxa de cruzamento também apresentou grande variação entre as plantas (variando de 0,359 a 0,778), indicando que a espécie não é auto-incompatível. Diferença significativa foi detectada entre as taxas de cruzamento multiloco e uniloco, sugerindo que ocorreram cruzamentos entre indivíduos aparentados na população ( $t_m - t_s = 0,302$ ), o que pode ter ocorrido devido à população conter indivíduos de mesma descendência (irmãos). A correlação multiloco de paternidade foi extremamente alta para a população ( $r_{p(m)} = 0,999$ ), confirmando que a progênie é constituída principalmente por irmãos-completos. A correlação de paternidade foi também maior entre frutos ( $r_{p(m)} = 0,998$ ) quando comparada dentro de frutos ( $r_{p(m)} = 0,888$ ). Em consequência das baixas taxas de cruzamentos e alta correlação de paternidade, o coeficiente de coancestria dentro da progênie foi alto ( $\Theta = 0,346$ ) e o tamanho efetivo foi menor do que o esperado em populações panmíticas ( $N_e = 4$ ). A ocorrência de 28% de indivíduos idênticos à planta-mãe sugere que o mecanismo da apomixia está ativo no pinhão manso e pode interferir nos modelos de cruzamentos mistos e cruzamentos correlacionados utilizados para estudar o sistema hierárquico de reprodução entre e dentro de frutos. Os resultados são discutidos destacando o sistema reprodutivo do pinhão manso em uma população base e suas implicações em programas de melhoramento genético, conservação e estudos de diversidade da espécie.

**Palavras-chave:** Tamanho efetivo populacional. Análise do sistema reprodutivo. Locos microssatélites. Árvore tropical.

**Abstract**

The hierarchical mating system between and within fruits of *Jatropha curcas* L. was investigated in a base population using six microsatellite loci, based on a mixed mating and correlated mating models. Open-pollinated seeds were collected from 15 seed-trees, sampling seven fruits per tree, providing a total of 21 seeds each. Deviation from random mating were shown (pointed) by the average multilocus mating rate ( $t_m = 0.603$ ), indicating that the species exhibit a mixed mating system. The outcrossing rate showed a large variation, ranging from 0.359 to 0.778, indicating that the species is not self-incompatible. Significant differences were detected between multilocus and single locus outcrossing rates, suggesting that crosses among related individuals occurred in the population ( $t_m - t_s = 0.302$ ), which could have occurred because the base population might contain individuals from the same offspring (sibs). The multilocus paternity correlation was extremely high for the population ( $r_{p(m)} = 0.999$ ), confirming that the progenies were composed mainly by full-sibs. The paternity correlation was higher between fruits ( $r_{p(m)} = 0.998$ ) than within fruits ( $r_{p(m)} = 0.888$ ). As a consequence of the low outcrossing rate and high paternity correlation, the co-ancestry coefficient within offspring was high ( $\Theta = 0.346$ ), and the effective population size was smaller than expected for panmitic populations ( $N_e = 4$ ). The occurrence of 28% of individuals identical to the mother plants suggested that an apomitical mechanism might be acting in physic nut and may interfere in the models for mixed and correlated crossings used to study the hierarchical system of reproduction within and between fruits. The results are discussed emphasizing the reproductive system of physic nut in a base population and its implications for genetic improvement and conservation of the species.

**Keywords:** Effective population size. Mating system analysis. Microsatellite loci. Tropical tree.

## 8.1 Introdução

Conhecer o sistema de reprodução de populações é fundamental em programas de melhoramento e conservação genética, visto que muitas etapas destes programas envolvem a reprodução sexual. O sistema de reprodução e os mecanismos de dispersão do pólen e sementes desempenham papel importante na composição genética de populações, pois determinam a forma como os genes são transferidos e recombinados para formar as gerações futuras, influenciando a distribuição da diversidade genética entre e dentro de populações (HAMRICK; LOVELESS, 1986; BROWN, 1990; MURAWSKI; HAMRICK, 1990; LEMES et al., 2003; GOODWILLIE et al., 2005).

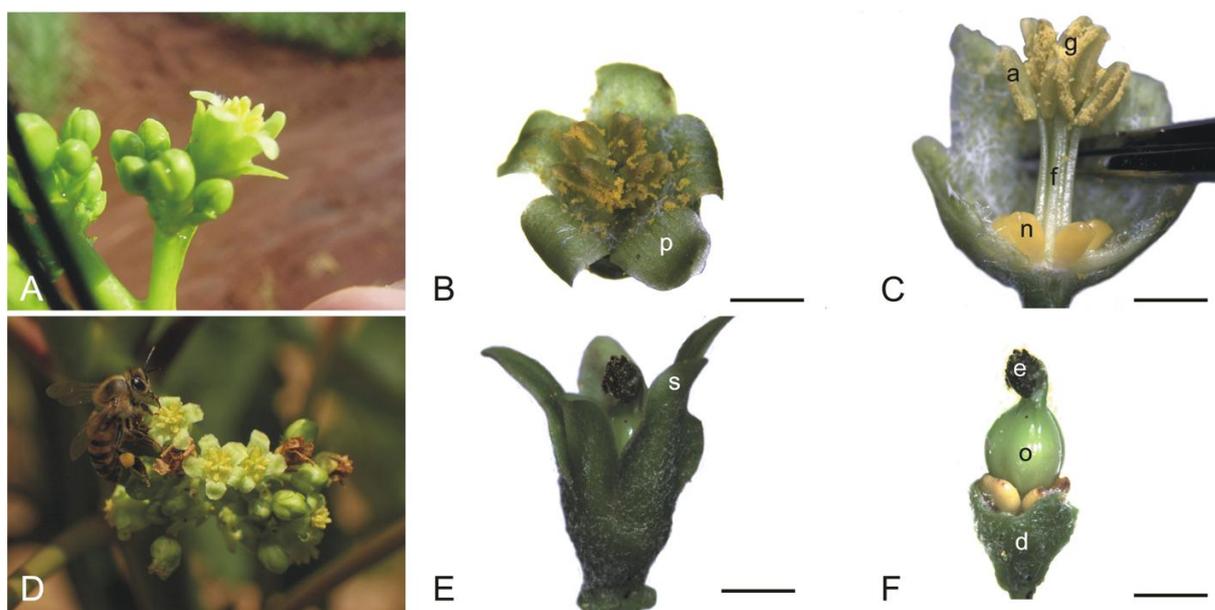
A reprodução sexual pode ocorrer por cruzamentos aleatórios, correlacionados, entre parentes, autofecundações e suas combinações e, em alguns casos raros por apomixia. Estudos do sistema de reprodução com base em marcadores genéticos, em espécies de plantas tropicais, especialmente arbóreas, têm mostrado que a grande maioria é originada de cruzamentos (MURAWSKI et al., 1990; MURAWSKI, 1995; LEMES et al., 2003; SILVA et al., 2011). Nas espécies alógamas a maior parte da diversidade genética está distribuída dentro das populações, diferentemente das autógamias onde a maior parte está entre as populações (HAMRICK; GODT, 1989). Assim, o conhecimento do sistema de reprodução permite delinear estratégias para a seleção de genótipos superiores nos programas de melhoramento e determinação de tamanhos amostrais para a conservação genética.

Marcadores genéticos como isoenzimas e microssatélites têm sido amplamente e eficientemente utilizados para o estudo dos padrões de reprodução e dispersão de sementes e pólen em plantas (ASHLEY, 2010). A utilização dessas técnicas associadas a modelos que descrevem a reprodução em plantas, como o modelo misto de reprodução (RITLAND; JAIN, 1981) e o modelo de cruzamentos correlacionados (RITLAND, 1989) permitem desvendar diversas características do processo de reprodução sexual em plantas, como autofecundações, cruzamentos aleatórios, entre parentes e correlacionados.

*Jatropha curcas* L. é uma oleaginosa nativa das Américas que possui potencial para a produção de biocombustíveis. Nos últimos anos a espécie tem sido estudada como fonte promissora para a produção de biodiesel (OPENSHAW, 2000; MODI et al., 2007; BERCHMANS; HIRATA, 2008), aspectos fitotécnicos (FAIRLESS, 2007; KOCCHAR et al., 2008), produção de fármacos (IGBINOSA et al., 2009), além de estudos sobre a diversidade genética da espécie (HELLER, 1996; GINWAL et al., 2004; BASHA; SUJATHA, 2007; KAUSHIK et al., 2007; RANADE et al., 2008; SUN et al., 2008; SUDDHER

PAMIDIMARRI et al., 2009; ROSADO et al., 2010). Entretanto, poucas foram as pesquisas que abordaram o sistema de reprodução (RAJU; EZDARANAM, 2002; SANTOS et al., 2005; JUHÁSZ et al., 2009). Detalhes da morfologia floral indicam que a espécie é monóica, cuja inflorescência é uma cimeira definida, onde as flores são unissexuais e produzidas na mesma inflorescência (PEIXOTO, 1973). As flores masculinas possuem dez estames, sendo mais numerosas e situadas nas pontas das ramificações (SATURNINO et al., 2005). As flores femininas são semelhantes às flores masculinas, porém são maiores. O ovário tem três carpelos, cada um com um único lóculo produzindo um óvulo (RAJU; EZDARANAM, 2002).

Quanto aos polinizadores, Raju e Ezradanam (2002) observaram que na base das flores femininas e masculinas existem glândulas elípticas produtoras de néctar favorecendo assim a polinização entomófila (Figura 8.1). Os principais polinizadores são abelhas (*Apis mellifera*), moscas, trips e formigas (RAJU; EZRADANAM, 2002; SATURNINO et al., 2005).



**Figura 8.1** – Aspecto da inflorescência e morfologia floral do pinhão manso observada. A) Flor masculina aberta; B) Pólen sobre as pétalas (Estereomicroscópio); C) Corte flor masculina (Estereomicroscópio); D) Visitação de polinizadores; E) Desenvolvimento do ovário (Estereomicroscópio); F) Presença dos nectários abaixo do ovário em desenvolvimento (Estereomicroscópio); pétala (p); nectários (n); filete (f); anteras (a); grãos de pólen (g); sépala (s); estigma (e); ovário (o); pedúnculo (d); Barras: 2 mm

Os marcadores moleculares baseados na amplificação do DNA estão sendo usados para a elucidação das relações filogenéticas do gênero *Jatropha*, estudos sobre variabilidade genética entre acessos de diferentes origens, visando o desenvolvimento de programas de melhoramento genético e algumas pesquisas ligadas a genética de populações da espécie (OVANDO-MEDINA et al., 2011). Os marcadores microssatélites tem se destacado por seu conteúdo informativo nos estudos de diversidade genética existentes entre acessos de diferentes regiões (BASHA; SUJATHA, 2007; SUN et al., 2008; BASHA et al., 2009; KUMAR et al., 2009; SUDHEER PAMIDIMARRI et al., 2009; ROSADO et al., 2010; SUDDHER PAMIDIMARRI et al., 2010). De maneira geral, os estudos de diversidade genética têm apontado a existência de pequena variabilidade genética no germoplasma analisado, principalmente nos cultivados na África e Sudeste Asiático. Rosado et al. (2010) aponta limitada variabilidade genética nos acessos brasileiros mantidos no banco de germoplasma da EMBRAPA. Os resultados sugerem que o sistema reprodutivo, mesmo com o florescimento típico de espécies alógamas, pode estar interferindo nos estudos sobre a diversidade genética da espécie.

O objetivo deste estudo foi investigar por meio de locos microssatélites a diversidade genética, os níveis de endogamia e o sistema de reprodução entre e dentro de frutos e entre plantas de uma população base de pinhão manso. Assim sendo, foram avaliadas árvores matrizes e suas progênies de polinização aberta. As seguintes questões foram abordadas: i) existe autofecundação e endogamia na população? ii) onde a correlação de paternidade é maior, entre ou dentro dos frutos? iii) o fenômeno da apomixia está presente no pinhão manso?

## **8.2 Material e Métodos**

### **8.2.1 Local do estudo**

O estudo sistema reprodutivo foi realizado em uma população base de pinhão manso. A população estudada era composta por plantas provenientes dos Estados de São Paulo e Bahia. O pomar (22°18.410' S e 47°22.640' W e altitude de 659 m) foi instalado em janeiro de 2006 no Campo Experimental da UFSCar, Araras-SP, em 1 ha e com 900 plantas, no espaçamento 4 m x 2 m. As progênies estudadas foram originadas a partir de sementes de polinização aberta de 15 árvores matrizes de oito procedências, sendo 13 árvores do Estado de

São Paulo provenientes das cidades de Araras (uma árvore), Holambra (cinco árvores), Jales (uma árvores), Lins (três árvores), Pirassununga (duas árvores) e Taubaté (uma árvore), e duas árvores proveniente de Cruz das Almas na Bahia.

### **8.2.2 Amostragem**

A coleta do material biológico foi realizada em maio de 2011, período em que existiam muitos frutos maduros. O estudo baseou-se em sementes de polinização aberta de 15 árvores matrizes, amostradas aleatoriamente dentro de uma população base. As matrizes foram georreferenciadas (GPS), identificadas e tiveram seus tecidos foliares e frutos amostrados (Tabela 8.1). De cada árvore matriz foram coletados em média 15 frutos, sendo selecionados sete por árvore matriz, os quais continham três sementes (o número de sementes por fruto variou de 1 a 3). Os frutos foram acondicionados separadamente em sacos de papel e identificados para garantir a correspondência entre o fruto, semente e o genitor materno. A identificação das sementes por fruto permite determinar a correlação de paternidade entre e dentro do fruto. As sementes foram plantadas em condições de viveiro, sendo colocadas para germinar sem nenhum tratamento, em tubetes contendo substrato e adubo adequado para a germinação. Em cada tubete colocou-se uma semente, totalizando uma média de 45 sementes plantadas por árvore matriz. Após três meses de desenvolvimento, as folhas recém-expandidas foram amostradas para posterior extração do DNA. Para o desenvolvimento do estudo foram utilizadas 21 progênie de cada árvore mãe.

### **8.2.3 Extração e quantificação do DNA**

Folhas recém expandidas foram coletadas e armazenadas em 96% etanol até o momento da extração do DNA genômico. A extração e quantificação do DNA foram descritas com maiores detalhes no Capítulo 3, itens 3.2.3 e 3.2.5.

**Tabela 8.1** – Procedência de 15 árvores matrizes utilizadas para determinar o sistema de reprodução em uma população base de pinhão manso. n – número de progênie estudada

Árvore	n			
ID		Local de Origem	Latitude	Longitude
L2P04	21	Jales, SP	22°18.426'S	47°22.627'W
L4P45	21	Pirassununga, SP	22°18.414'S	47°22.696'W
L3P27	21	Lins, SP	22°18.417'S	47°22.691'W
L4P29	21	Lins, SP	22°18.418'S	47°22.676'W
L5P63	21	Cruz das Almas, BA	22°18.411'S	47°22.713'W
L4P51	21	Cruz das Almas, BA	22°18.413'S	47°22.703'W
L8P01	21	Pirassununga, SP	22°18.412'S	47°22.633'W
L1P09	21	Araras, SP	22°18.432'S	47°22.613'W
L6P19	21	Holambra, SP	22°18.410'S	47°22.656'W
L10P10	21	Holambra, SP	22°18.407'S	47°22.646'W
L9P09	21	Holambra, SP	22°18.409'S	47°22.642'W
L3P14	21	Lins, SP	22°18.415'S	47°22.701'W
L2P10	21	Holambra, SP	22°18.423'S	47°22.639'W
L7P11	21	Taubaté, SP	22°18.409'S	47°22.645'W
L6P10	21	Holambra, SP	22°18.411'S	47°22.655'W

#### 8.2.4 Amplificação do DNA

Para as análises dos locos procedeu-se a amplificação de regiões microssatélites, utilizando seis pares de iniciadores (Tabela 8.2). As reações de amplificação dos locos de microssatélites foram descritas com maiores detalhes no Capítulo 3, item 3.2.7.

## 8.2.5 Análises dos dados

### 8.2.5.1 Análise da diversidade genética e índice de fixação

A diversidade genética da geração adulta (matrizes) e das progênies foi caracterizada pelos índices: número médio de alelos por loco ( $A$ ), heterozigosidade observada ( $H_o$ ) e heterozigosidade esperada ( $H_e$ ), segundo expectativas do equilíbrio de Hardy-Weinberg. Também foi estimado o índice de fixação ( $F$ ) nas matrizes e nas progênies. Para verificar se os valores de  $F$  eram significativamente diferentes de zero, utilizou-se 1.000 permutações (método Monte Carlo) de alelos entre os indivíduos e para evitar falsos positivos utilizou-se uma correção de Bonferroni (95%,  $\alpha = 0,05$ ). Todos os índices e as permutações foram estimadas utilizando os programas GDA ( Genetic Data Analysis; LEWIS; ZAYKIN, 2006) e FSTAT (GOUDET, 1995).

### 8.2.5.2 Análise do sistema de reprodução

A análise do sistema de reprodução foi baseada no modelo misto de reprodução (RITLAND; JAIN, 1981) e no modelo de cruzamentos correlacionados (RITLAND, 1989), utilizando o programa “Multilocus MLTR”, versão 3.4 (RITLAND, 2002). Os parâmetros estimados foram: taxa populacional de cruzamento multilocus ( $t_m$ ), taxa populacional de cruzamento unilocus ( $t_s$ ), correlação de autofecundação ( $r_s$ ) e correlação multilocus de paternidade ( $r_{p(m)}$ ). A diferença entre a taxa de cruzamento multilocus e unilocus ( $t_m - t_s$ ) foi utilizada para determinar a existência de cruzamento entre parentes dentro da população. Diferenças positivas e significativas entre  $t_m$  e  $t_s$  foram atribuídas ao cruzamento entre indivíduos aparentados, porque  $t_s$  representa a taxa de cruzamento entre não-aparentados (SHAW et al., 1981). Os parâmetros  $t_m$ ,  $t_s$ ,  $t_m - t_s$  e  $r_{p(m)}$  foram também estimados ao nível de famílias e a correlação  $r_{p(m)}$  foi estimada entre e dentro de frutos. A análise foi realizada ao nível de populações usando o método numérico de Newton-Raphson e ao nível de famílias individuais e frutos usando o método numérico de Expectation-Maximization. O número efetivo médio de doadores de pólen por árvore matriz e entre e dentro de frutos foi estimado por  $\hat{N}_{e(p)} = 1/\hat{r}_{p(m)}$  (RITLAND, 1989). O coeficiente de coancestralidade médio ( $\Theta$ ) dentro de

famílias foi calculado a partir de um estimador do coeficiente de parentesco dentro de famílias ( $r_{xy}$ ), conforme derivado por Ritland (1989). Como a população estudada é artificial,  $r_{xy}$  foi estimado de acordo com  $r = 2\Theta$ , e o coeficiente de coancestria dentro de famílias foi estimado dividindo os estimadores de Ritland por dois ( $\hat{\Theta} = \hat{r}/2 = 0.125(1 + \hat{F}_p)[4\hat{s} + (t_m^2 + \hat{s}t_m r_s)(1 + r_{p(m)})]$ ). Outro parâmetro estimado foi o tamanho efetivo populacional médio dentro de famílias ( $N_e$ ) usando o estimador de Cockerham (1969):  $\hat{N}_e = 0.5 / \{ \hat{\Theta}[(n-1)/n] + [(1 + \hat{F}_o)/2n] \}$ , em que  $n$  é o número de sementes analisadas dentro de famílias ( $n = 21$ ) e  $F_o$  é o coeficiente de endogamia na progênie (estimada pelo índice de fixação). Nesta estimativa, valores negativos de  $F_o$  foram assumidos como sendo zero. A partir do tamanho efetivo populacional dentro de famílias, foi estimado o número de árvores ( $m$ ) necessário para a coleta de sementes de modo a reter o tamanho efetivo populacional de referência ( $N_{e(\text{reference})}$ ) de 150 (3 x 50; LACERDA et al., 2008). Este cálculo foi estimado de acordo com a relação entre o tamanho efetivo populacional ideal do programa de conservação ( $N_{e(\text{reference})}$ ), e o tamanho efetivo populacional estimado para a média das matrizes ( $N_e$ ):  $\hat{m} = N_{e(\text{reference})} / \hat{N}_e$  (SEBBENN, 2006). Essa expressão é baseada em duas suposições: i) as matrizes não são aparentadas; e ii) as matrizes não recebem um conjunto de pólen sobreposto. Portanto, neste caso, assume-se que as matrizes não cruzaram entre si e não receberam pólen dos mesmos pais (SILVA et al., 2011).

**Tabela 8.2** – Seis locos microssatélites de pinhão manso com seus iniciadores específicos e suas características

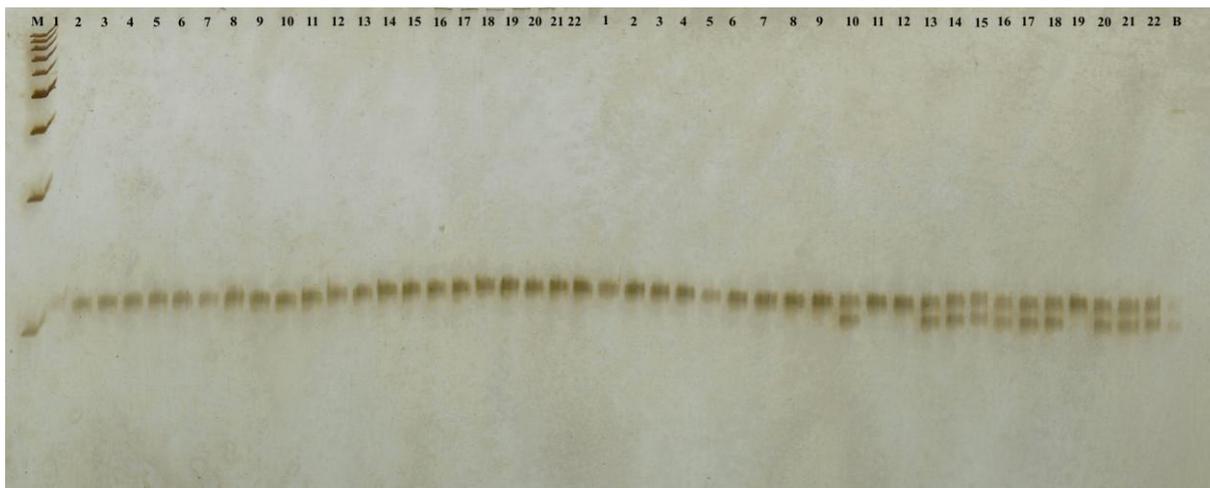
<i>Locos</i>	<b>Motivo</b>	<b>Iniciadores</b>	
		<b>Foward</b>	<b>Reverse</b>
<i>mJCENA27</i>	(GA) <sub>12</sub>	CATTTTTTCATCAAGGCCTAC	GTATTTCTCCACACGCAACT
<i>mJCENA41</i>	(AC) <sub>18</sub>	CACTTACCCCTCACTCAGAA	AAAGCCAGGACATACTTGAA
<i>mJCENA87</i>	(GT) <sub>15</sub> (GA) <sub>8</sub>	TAAGTTCCCAGTTCCTGCTA	CACATGGTAAGCATTACAAGC
<i>mJCENA108</i>	(GAA) <sub>10</sub>	GTGTGGTGCTTACCCCTATTTT	GCCTCCTTTTCTTTTCCTGTTT
<i>mJCENA110</i>	(GT) <sub>14</sub>	GCGTAGAAACACAGGAACATCA	ACTCTCAATGGTTGTTATGGGC
<i>mJCENA111</i>	(AT) <sub>6</sub> (GT) <sub>6</sub>	AAGCCCAGTTGCTCATATTCAG	CAAGGCTCAAAGATAGAAGGGA

## 8.3 Resultados e Discussão

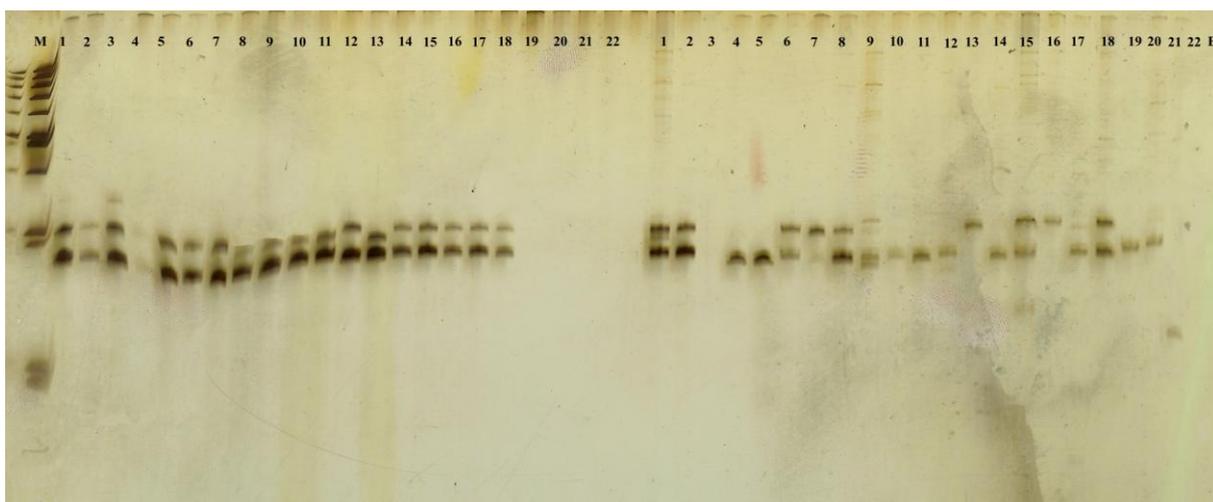
### 8.3.1 Análise da diversidade genética e endogamia

Quinze frutos foram colhidos a partir de cada árvore matriz, sendo semeadas 45 sementes que tiveram sua taxa de germinação variando de 89-97% aos 30 dias após a semeadura. A taxa de germinação de sementes de polinização aberta foi elevada, semelhante aos valores relatados em condições de viveiro para pinhão manso (JUHÁSZ et al., 2009). Considerando-se que as sementes são originárias de uma mistura de cruzamento e autofecundação e a taxa de germinação foi alta, sugere-se a não existência de depressão por endogamia. Sorensen e White (1988) citam que a taxa de autofecundação pode ser mascarada durante a fase de viveiro pelo aborto de sementes antes da germinação e mortes ocorridas nas fases iniciais de desenvolvimento pela ação de genótipos em homozigose para genes letais e deletérios, pela ação da depressão por endogamia. Raju e Ezradanam (2002) observaram a presença de frutos xenogâmicos e gitonogâmicos, porém seus resultados apontam que os últimos abortaram antes de completar seu desenvolvimento. Abdelgadir et al. (2008) relatam o desenvolvimento normal de frutos obtidos tanto a partir da fecundação cruzada quanto por autofecundação. Juhász et al. (2009) relatam que a taxa de frutificação variou de 79 a 96% para autofecundação manual, gitonogamia e xenogamia.

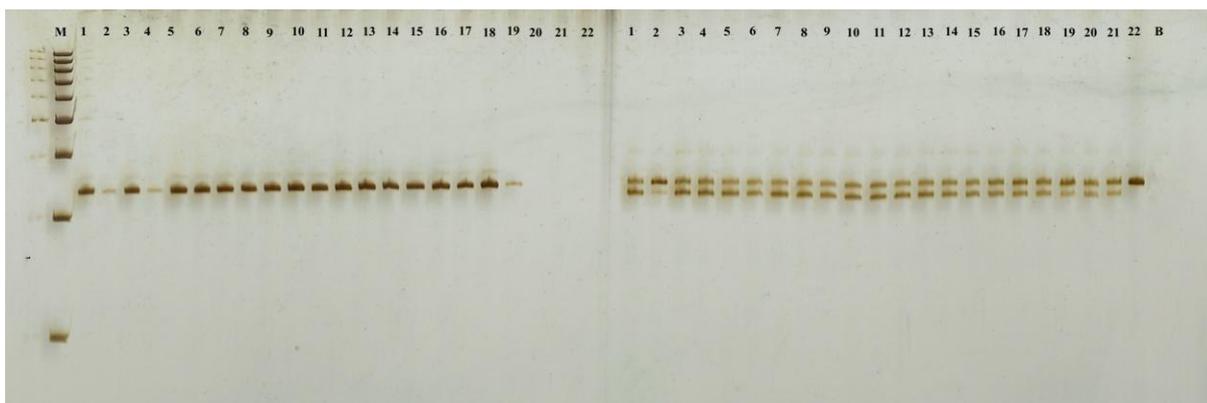
O DNA foi extraído das 15 árvores matrizes e 21 progênies de cada árvore mãe. Para a determinação da taxa de cruzamento foram testados nove locos microssatélites (apresentados com maiores detalhes no capítulo 3), dos quais somente seis apresentaram perfis polimórficos (JCENA27, JCENA41, JCENA87, JCENA108, JCENA110 e JCENA111) para os genótipos analisados (Figuras 8.2; 8.3; 8.4).



**Figura 8.2** - Padrão de amplificação gerado pelo iniciador *mJCENA87* (M: marcador 100 pb; 1 – matriz L7P11 ; 2 a 22 – progênie; 1 – matriz L6P10; 2 a 22 – progênie; B: branco)



**Figura 8.3** - Padrão de amplificação gerado pelo iniciador *mJCENA108* (M: marcador 100 pb; 1 – matriz L3P27; 2 a 22 – progênie; 1 – matriz L5P63; 2 a 22 – progênie; B: branco)



**Figura 8.4** - Padrão de amplificação gerado pelo iniciador *mJCENA111* (M: marcador 100 pb; 1 – matriz L4P29; 2 a 22 – progênie; 1 – matriz L5P63; 2 a 22 – progênie; B: branco)

A população estudada apresentou baixo nível de polimorfismo para os seis locos utilizados (Tabela 8.3). O número total de alelos detectados nos seis locos foi de 26 alelos para as árvores matrizes e 28 para as progênies analisadas. O número médio de alelos por loco foi de 4,3 alelos para as árvores matrizes e 4,7 para as progênies (Tabela 8.3). A heterosigosidade média observada das matrizes ( $H_o = 0,62$ ) não difere das progênies ( $H_o = 0,61$ ), porém, a heterozigosidade esperada foi significativamente maior nas progenies ( $H_e = 0,46$ ) do que nas matrizes ( $H_e = 0,41$ ) (Tabela 8.3).

O índice de fixação foi significativamente diferente de zero para o loco *mJCENA87* para árvores matrizes e para três locos (*mJCENA41*, *mJCENA87* e *mJCENA111*) para progênies (Tabela 8.3). Nossos resultados indicam que os indivíduos obtidos por autofecundação, não foram eliminados pela depressão endogâmica, pois o índice de fixação foi significativamente diferente de zero para a média das progênies, sugerindo a existência da endogamia.

**Tabela 8.3** – Diversidade genética e índice de fixação para árvores matrizes e progênies de uma população base de pinhão manso.  $A$  é o número de alelos por locos;  $H_o$  e  $H_e$  são a heterozigosidade observada e esperada respectivamente;  $F$  é o índice de fixação

<i>Locos</i>	Árvores matrizes (n=15)				Progênies (n=315)			
	<i>A</i>	$H_o$	$H_e$	<i>F</i>	<i>A</i>	$H_o$	$H_e$	<i>F</i>
<i>mJCENA27</i>	1	0.00	0.00	0.000	2	0.03	0.04	-0.016
<i>mJCENA41</i>	5	0.77	0.53	0.307	5	0.73	0.64	0.127*
<i>mJCENA87</i>	4	0.61	0.07	0.891*	4	0.63	0.23	0.633*
<i>mJCENA108</i>	5	0.76	0.93	-0.221	5	0.74	0.83	-0.119
<i>mJCENA110</i>	5	0.69	0.60	0.134	6	0.69	0.63	0.084
<i>mJCENA111</i>	6	0.85	0.33	0.610*	6	0.80	0.40	0.497*
<b>Média</b>	<b>4.3</b>	<b>0.62</b>	<b>0.41</b>	<b>0.332 *</b>	<b>4.7</b>	<b>0.61</b>	<b>0.46</b>	<b>0.237*</b>
<b>SD</b>	<b>1.7</b>	<b>0.31</b>	<b>0.35</b>	<b>0.429</b>	<b>1.5</b>	<b>0.29</b>	<b>0.29</b>	<b>0.298</b>
<b>Total</b>	<b>26</b>				<b>28</b>			

\*  $P < 0.05$  Correção de Bonferroni

### 8.3.2 Sistema de cruzamento

Nas condições deste estudo, o pinhão manso apresentou um sistema de reprodução misto, produzindo sementes tanto por fecundação cruzada quanto por autofecundação ( $t_m = 0,603$ ; Tabela 8.4). O pinhão manso é uma espécie monóica que produz flores masculinas e femininas na mesma inflorescência (DIVAKARA et al., 2010). Normalmente, o pinhão é uma espécie protândrica, onde as flores masculinas são as primeiras a atingirem a maturidade. Essa estratégia favorece a polinização cruzada (xenogamia) e coloca a autopolinização (geitonogamia) em desvantagem (CHANG-WEI et al., 2007; LUO et al., 2007; DIVAKARA et al., 2010). Os polinizadores também podem interferir nas taxas de cruzamento e

autopolinização (VOGLER; KALISZ, 2001; KALISZ et al., 2004). O sistema de misto de reprodução, com o favorecimento da fecundação cruzada, é observado em outras Euphorbiaceas como a mandioca (COLOMBO et al., 2000; SILVA et al., 2003) e seringueira (FURLANI et al. 2005), enquanto que a combinação de alogamia e autogamia foi descrita por Bajay et al. (2011) para mamona (*Ricinus communis* L.).

A correlação de autofecundação foi alta e significativamente diferente de zero ( $r_s = 0,424$ ), o que sugere alta variação nas taxas de cruzamento individual (Tabela 8.5). Em concordância, a taxa de cruzamento multilocos ( $t_m$ ) variou entre as progênies de 0,26 a 1,00 (Tabela 8.4). A estimativa da taxa de cruzamento é semelhante a estudos anteriores para gênero *Jatropha* (SANTOS et al., 2005).

Das 15 progênies, 11 apresentaram taxa de cruzamento multilocos significativamente diferente da unidade (Tabela 8.5). A taxa de cruzamento uniloco foi também significativamente diferente da unidade ( $t_s = 0,301$ ,  $P < 0,05$ ) (Tabela 8.4). A diferença entre a taxa de cruzamento multilocus e unilocos ( $t_m - t_s$ ; Tabela 8.4) foi positiva e significativamente diferente de zero ( $t_m - t_s = 0,302$ ;  $P < 0,05$ ), indicando que ocorreram cruzamentos entre parentes na população base. Em nível de progênies (Tabela 8.4), a diferença  $t_m - t_s$  foi significativamente diferente de zero para nove das 15 progênies (Tabela 8.5). A ocorrência de acasalamento entre parentes foi associada com a existência de parentesco entre os indivíduos na população base, provavelmente porque a população continha várias árvores derivadas da mesma árvore matriz (meios irmãos ou irmãos completos). Os cruzamentos biparentais também podem ter se originado a partir de outras razões, como o comportamento dos polinizadores visitando indivíduos relacionados dentro da população base.

O coeficiente de coancestralidade variou nas famílias ( $\Theta$ ) entre as matrizes, dentro das progênies e entre as progênies (Tabela 8.4). Em consequência das autofecundações e dos cruzamentos correlacionados, a coancestria dentro de progênies ( $\Theta = 0,346$ ) foi maior e o tamanho efetivo de variância ( $N_e = 1,42$ ) menor do que o esperado em populações panmíticas ( $\Theta = 0,125$ ;  $N_e = 4$ ). Entre as progênies, o coeficiente de coancestria variou de 0,202 a 0,440 e o tamanho efetivo de variância ( $N_e$ ) variou de 1,13 a 2,25. O coeficiente médio de coancestralidade entre plantas dentro de progênies foi maior do que esperado em progênies coletadas de populações panmíticas ( $\Theta_{xy} = 0,125$ ). Essas estimativas da variação genética aditiva e parâmetros genéticos como herdabilidades e ganhos esperados na seleção de

programas de melhoramento genético devem ponderar os desvios de cruzamentos aleatórios, causados pelas autofecundações, cruzamentos entre parentes e cruzamentos correlacionados. Em função da coancestria dentro de progênies ser maior do que a esperada em progênies de meio-irmãos, o tamanho efetivo populacional ( $N_e$ ) foi menor do que esperado em populações panmíticas. Esses resultados também se devem ao sistema misto de reprodução, combinando autofecundações, cruzamentos entre parentes e cruzamentos correlacionados. Estes fatores aumentam o parentesco e a endogamia dentro das progênies, portanto, a frequência de alelos idênticos por descendência, o que reduz o tamanho efetivo.

Outro ponto que chama a atenção é a ocorrência de 28% de indivíduos idênticos à planta-mãe. Uma possibilidade é que os frutos estão se desenvolvendo a partir de flores femininas, ou seja, por apomixia. Pode-se supor que esteja ocorrendo o desenvolvimento de frutos a partir de flores femininas. A apomixia aparece como um fenômeno comum nas angiospermas, já tendo sido constatada em mais ou menos 300 espécies incluídas em 95 gêneros de 35 famílias de mono e dicotiledôneas (CRUZ et al., 1998). O fenômeno da apomixia foi relatado em campo para pinhão manso com uma taxa de 32% na Índia (BHATTACHARYA et al., 2005) e na China (CHANG-WEI et al., 2007). No Brasil, Juhász et al. (2009) descreveram a presença de 5% de frutos apomíticos em um experimento realizado no campo no Norte de Minas Gerais. No nosso estudo os indivíduos apomíticos chegam a influenciar os resultados dos modelos de cruzamentos mistos e correlacionados utilizados para estudar o sistema hierárquico de reprodução. A apomixia interfere efetivamente em vários parâmetros do sistema de reprodução, porém a correlação de autofecundação ( $r_s$ ) é o parâmetro que é mais alterado, pois varia 0,424 para 0,610, após a eliminação dos indivíduos apomíticos (Tabela 8.4).

**Tabela 8.4** – Estimativa de parâmetros do sistema de reprodução, coancestria e tamanho efetivo em uma população base de pinhão manso

Parâmetros	Estimativas (95% CI)	Estimativas – sem apomítico (95% CI)
Taxa de cruzamento multilocos: $t_m$	0.603 (0.359 to 0.778)	0.733 (0.710 to 0.756)
Taxa de cruzamento unilocos: $t_s$	0.301 (0.204 to 0.453)	0.373 (0.360 to 0.386)
Taxa de cruzamento entre parentes: $t_m - t_s$	0.302 (0.155 to 0.325)	0.360 (0.345 to 0.375)
Correlação de autofecundação: $r_s$	0.424 (0.241 to 0.624)	0.610 (0.529 to 0.691)
Correlação multiloco de paternidade (entre e dentro): $r_{p(m)aw}$	0.999 (0.881 to 1.000)	0.999 (0.982 to 1.016)
Número médio de árvores polinizadoras: $\hat{N}_{ep} = 1/r_{p(m)aw}$	1.00 (1.00 to 1.13)	1.00 (0.98 to 1.02)
Coancestria dentro de famílias: $\Theta$	0.346 (0.292 to 0.384)	0.294 (0.287 to 0.300)
Tamanho efetivo médio da população: $N_e$	1.42 (1.29 to 1.67)	1.50 (1.47 to 1.53)
Número de árvores matrizes para a coleta de sementes (dentro de frutos): $m$	105 (90 to 116)	100 (98 to 102)
<b>Dentro e entre frutos</b>		
Correlação de paternidade multilocos dentro de frutos: $r_{p(m)w}$	0.888 (0.858 to 0.878)	0.957 (0.954 to 0.960)
Correlação de paternidade multilocos entre frutos: $r_{p(m)a}$	0.998 (0.955 to 1.041)	0.999 (0.974 to 1.024)
Número efetivo de doadores de pólen dentro de frutos: $1/r_{p(m)w}$	1.15 (1.14 to 117)	1.04 (1.04 to 1.05)
Número efetivo de doadores de pólen entre frutos: $1/r_{p(m)a}$	1.00 (1.00 to 1.05)	1.00 (0.98 to 1.03)
Coeficiente de coancestria dentro de frutos: $\Theta_w$	0.341 (0.283 to 0.384)	0.293 (0.286 to 0.299)
Coeficiente de coancestria entre frutos: $\Theta_a$	0.346 (0.292 to 0.385)	0.294 (0.287 to 0.300)
Tamanho efetivo médio populacional dentro de frutos: $N_{e(w)}$	1.45 (1.29 to 1.72)	1.04 (1.47 to 1.53)
Tamanho efetivo médio populacional entre frutos: $N_{e(a)}$	1.42 (1.28 to 1.67)	1.04 (1.47 to 1.53)
Número de árvores matrizes para a coleta de sementes dentro de frutos: $m_w$	104 (87 to 116)	100 (98 to 102)
Número de árvores matrizes para a coleta de sementes entre frutos: $m_a$	105 (90 to 117)	100 (98 to 102)

**Tabela 8.5** – Sistema de cruzamento e parâmetros intra-familiar em uma população de pinhão manso.  $n$  tamanho da amostra para cada família;  $t_m$  taxa de cruzamento multilocos;  $t_m - t_s$  taxa de cruzamento entre parentes;  $r_{p(m)}$  correlação de paternidade multilocos;  $N_{ep}$  número efetivo de doadores de pólen;  $\Theta$  coeficiente de coancestria dentro de famílias;  $N_e$  tamanho efetivo populacional dentro de famílias. Média  $\pm$  95% intervalo de confiança

Matrizes	$n$	$t_m$	$t_m - t_s$	$r_{p(m)}$	$N_{ep}$	$\Theta$	$N_e$
L2P04	21	0.26 $\pm$ 0.10	-0.10 $\pm$ 0.07	0.25 $\pm$ 0.08	4.0	0.381	1.29
L4P45	21	0.45 $\pm$ 0.11	0.07 $\pm$ 0.07	0.46 $\pm$ 0.08	2.2	0.314	1.53
L3P27	21	0.72 $\pm$ 0.10	0.22 $\pm$ 0.07	0.80 $\pm$ 0.03	1.3	0.255	1.84
L4P29	21	0.99 $\pm$ 0.01	0.23 $\pm$ 0.04	0.62 $\pm$ 0.06	1.6	0.202	2.25
L5P63	21	0.21 $\pm$ 0.08	-0.06 $\pm$ 0.06	0.14 $\pm$ 0.04	7.4	0.400	1.23
L4P51	21	0.63 $\pm$ 0.11	0.14 $\pm$ 0.07	0.62 $\pm$ 0.05	1.6	0.266	1.78
L8P01	21	0.83 $\pm$ 0.09	0.18 $\pm$ 0.06	0.75 $\pm$ 0.02	1.3	0.236	1.97
L1P09	21	0.45 $\pm$ 0.11	0.10 $\pm$ 0.07	0.34 $\pm$ 0.08	2.9	0.311	1.55
L6P19	21	1.00 $\pm$ 0.01	0.23 $\pm$ 0.02	0.90 $\pm$ 0.00	1.1	0.238	1.96
L10P10	21	0.12 $\pm$ 0.06	-0.30 $\pm$ 0.03	0.11 $\pm$ 0.00	9.1	0.440	1.13
L9P09	21	1.00 $\pm$ 0.01	0.10 $\pm$ 0.02	0.77 $\pm$ 0.04	1.3	0.220	2.09
L3P14	21	0.78 $\pm$ 0.09	0.15 $\pm$ 0.06	0.61 $\pm$ 0.05	1.6	0.232	2.00
L2P10	21	0.98 $\pm$ 0.02	0.20 $\pm$ 0.02	0.93 $\pm$ 0.00	1.1	0.242	1.93
L7P11	21	0.35 $\pm$ 0.10	0.06 $\pm$ 0.07	0.28 $\pm$ 0.08	3,6	0.344	1.41
L6P10	21	0.44 $\pm$ 0.10	-0.05 $\pm$ 0.06	0.46 $\pm$ 0.08	2.2	0.314	1.53

### 8.3.3 Cruzamentos correlacionados entre e dentro de frutos

Para estudar o grau de parentesco ocorrido entre e dentro dos frutos coletaram-se frutos de polinização aberta, os quais foram acondicionados separadamente em saco de papel, identificados para garantir a correspondência entre o fruto, a semente e o genitor.

Esse tipo de organização permite a identificação das sementes por fruto correlacionando à paternidade entre e dentro do fruto.

Os parâmetros genéticos utilizados para estudar o grau de parentesco entre os frutos foram a taxa de cruzamento, taxa de cruzamento entre parentes, correlação de paternidade, o número efetivo de doadores de pólen, o coeficiente de coancestralidade, tamanho efetivo da população dentro das famílias e o número de matrizes necessárias para coletar sementes (Tabela 8.4). Os resultados dos cruzamentos correlacionados entre ( $r_{p(m)a} = 0,999$ ) e dentro de frutos ( $r_{p(m)w} = 0,957$ ) sugere que a maior parte das progênies de cruzamentos são irmãos-completos. Em concordância, o coeficiente médio de coancestralidade entre plantas dentro de progênies (0,293) foi maior do que esperado em progênies de irmãos-completos (0,25), sugerindo que os polinizadores têm grande influência sobre o sistema reprodutivo do pinhão manso que não possui nenhuma barreira para as misturas de irmãos por autofecundação, meio-irmãos e irmãos-completos. Esses resultados ajudam a explicar a pequena diversidade genética relatada nos estudos com germoplasma de pinhão manso (BASHA; SUJATHA, 2007; KAUSHIK et al., 2007; RANADE et al., 2008; SUN et al., 2008; SUDDHER PAMIDIMARRI et al., 2009; ROSADO et al., 2010). Altas correlações de paternidade em progênie de polinização aberta foram descritos para *Euterpe edulis* M. (GAIOTTO et al., 2003), *Chorisia speciosa* (SOUZA et al., 2003) e *Teobroma grandiflorum* (ALVES et al., 2003). Segundo Ritland (1989), altas e significativas correlações de paternidade indicam que o número de polinizadores efetivos é restrito e que a polinização ocorre dentro das vizinhanças de uma árvore materna e que todas as árvores vizinhas têm a probabilidade de polinizar uma determinada árvore e que a polinização decorre de visitas independentes dos polinizadores (KALISZ et al., 2004). Sendo assim, a causa da correlação de paternidade para pinhão manso pode estar associada ao assincronismo do florescimento e ao comportamento do polinizador visitando de forma sistemática as árvores próximas.

### 8.3.4 Implicações para conservação e melhoramento genético

Conhecer o tamanho efetivo de variância médio dentro de progênies ( $N_e$ ) é importante em programas de melhoramento e conservação genética, visto a necessidade de coletarem-se amostras de progênies de polinização aberta para estes fins. Quanto

menor for o  $N_e$ , maior será o tamanho da amostra de sementes de polinização aberta que terá de ser coletada para estes fins. O tamanho efetivo de variância foi baixo e similar entre ( $N_{e(a)} = 1.04$ ) e dentro ( $N_{e(w)} = 1.04$ ) de frutos (Tabela 8.4). Estes valores foram aproximadamente 64% menores do que o valor esperado em progênies de meios ( $N_e = 4$ ). Conseqüentemente, para o pinhão manso, os resultados revelam a necessidade de coletar sementes de pelo menos 100 árvores matrizes, para obter lotes de sementes com o tamanho efetivo de referência de 150 (LACERDA et al., 2008; SILVA et al., 2011). Sendo assim, muitos estudos de diversidade podem ter subestimado o tamanho efetivo das populações analisadas. Contudo, é importante ressaltar que nestas estimativas do número de árvores matrizes, esta se considerando que serão coletadas muitas sementes por árvore matriz (pelo menos 20 sementes), que as árvores matrizes não são parentes entre si, que estas matrizes não se cruzaram e não receberam um conjunto sobreposto de pólen (ausência de parentesco entre plantas de diferentes matrizes). Caso contrário, este número deveria ser ainda maior, devido à ocorrência de parentesco entre plantas de diferentes matrizes.

#### 8.4 Conclusão

Nossos resultados indicam que o pinhão manso apresenta um sistema misto de reprodução, combinando autofecundações, apomixia e o cruzamento entre indivíduos aparentados o que pode explicar a pequena diversidade genética encontrada dentro das populações. Devido ao sistema misto de reprodução e aos acasalamentos correlacionados a coleta de sementes de polinização aberta para fins de melhoramento ou conservação devem ser conduzidas em um número de árvores acima de 100, visando garantir uma amostra estruturada que represente um tamanho efetivo populacional de 150.

#### Referências

ABDELGADIR, H. A.; JOHNSON, S. D.; VAN STADEN, J. Approaches to improve seed production of *Jatropha curcas* L. **South African Journal of Botany**, Pretoria, v. 74, p. 359, 2008.

- ALVES, R. M.; SEBBENN, A. M.; ARTERO, A. S.; CLEMENT, C.; FIGUEIRA, A. Mating system in natural population of *Theobroma grandiflorum* (Willd ex Spreng) Shumm. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 26, p. 373-379, 2003.
- ASHLEY, M. V. Plant parentage, pollination, and dispersal: how DNA microsatellites have altered the landscape. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v. 29, p. 148–161, 2010.
- BAJAY, M. M.; ZUCCHI, M. I.; KIIHL, T. A. M.; BATISTA, C. E. A.; MONTEIRO, M.; PINHEIRO, J. B. Development of a novel set of microsatellite markers for castor bean, *Ricinus communis* (Euphorbiaceae). **American Journal of Botany**, New York, v. 98, p. 87-89, 2011. doi: 10.3732/ajb.10000395.
- BASHA, S. D.; SUJATHA, M. Inter and intra-population variability *Jatropha curcas* characterized by RAPD and ISSR markers and development of population-specific SCAR markers. **Euphytica**, Wageningen, v. 156, p. 375-386, 2007.
- BERCHMANS, H. J.; HIRATA, S. Biodiesel production from crude *Jatropha curcas* L. seed oil with a high content of free fatty acids. **Bioresource Technology**, Essex, v. 99, p. 1716-1721, 2008. doi: 10.1016/j.biortech. 2007.03.051
- BHATTACHARYA, A.; DATTA, K.; DATTA, S. K. Floral biology, floral resource constraints and pollination limitation in *Jatropha curcas* L. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, Faisalabad, Pakistan, v. 8, p. 456-460, 2005.
- BROWN, A. H. D. Genetic characterization of plant mating system. In: BROWN, A. H. D.; CLEGG, M. T.; KAHLED, A. L.; WEIR, B. S. (Ed.). **Plant population genetics, breeding and genetic resources**. Sunderland, MA: Sinauer, 1990. p. 145-162.
- CHANG-WEI, L.; KUN, L.; YOU, C.; YOUNG-YU, S. Floral display and breeding system of *Jatropha curcas* L. **Forestry Studies in China**, Beijing, v. 10, p. 114-119, 2007.
- COCKERHAM, C.C. Variance of gene frequencies. **Evolution**, Lancaster, v. 23, p. 72-84, 1969.
- COLOMBO, C.; SECOND, G.; CHARRIER, A. Diversity within American cassava germplasm based on RAPD markers. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 23, n. 1, p. 189-199, 2000.
- CRUZ, R. P.; FEDERIZZI, L. C.; MILACH, S. C. K. A apomixia no melhoramento de plantas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 28, n. 1, p. 155-161, 1998.
- DIVAKARA, B. N.; UPADHYAYA, H. D.; WANI, S. P; LAXMIPATHI-GOWDA, C. L. Biology and genetics improvement of *Jatropha curcas* L.: A review. **Applied Energy**, London, v. 87, p. 732-742, 2010.
- FAIRLESS, D. The little shrub that could –maybe. **Nature**, London, v. 449, p. 652-655, 2007.

FURLANI, R. C. M.; MORAES, M. L. T.; RESENDE, M. D. V.; FURLANI JUNIOR, E.; GONÇALVES, P. S.; VALÉRIO FILHO, W. V.; PAIVA, J. R. Estimation of variance components and prediction of breeding values in rubber tree breeding using the REML/BLUP procedure. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 28, n. 2, p. 271-276, 2005.

GAIOTTO, F. A.; GRATAPAGLIA, D.; VENCOVSKY, R. Genetic structure, mating system, and long-distance gene flow in Heart of Palm (*Euterpe edulis* Mar.). **Journal of Heredity**, Washington, DC, v. 94, n. 5, p. 399-406, 2003.

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

GOODWILLIE, C.; KALISZ, S.; ECKERT, C.G. The evolutionary enigma of mixed mating systems in plants: occurrence, theoretical explanations, and empirical evidence. **Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics**, Palo Alto, v. 36, p. 47-79, 2005.

GOUDET, J. FSTAT. (Version 2.9.3.2.): a computer program to calculate *F*-statistics. **Journal Heredity**, Washington, DC, v. 86, p. 485-486, 1995.

HAMRICK, J. L.; GODT, J. W. Allozyme diversity on plant species. In: BROWN, A. H. D.; CLEGG, M. J.; KAHLER, A. L.; WEIR, B. S. (Ed.). **Plant population genetics, breeding, and genetic resources**. Sunderland, MA: Sinauer Associates, 1989. p. 43-63.

HAMRICK, J. L.; LOVELESS, M. D. Isozyme variation in tropical trees; procedures and preliminary results. **Biotropica**, Washington, DC, v. 8, p. 201-207, 1986.

HELLER, J. **Physic nut, *Jatropha curcas* L.:** promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. Rome: International Plant Genetic Resource Institute, 1996. 66 p.

IGBINOSA, O. O.; IGBINOSA, E. O.; AIYEGORO, O. A. Antimicrobial activity and phytochemical screening of stem bark extracts from *Jatropha curcas* L. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, Victoria Island, Lagos, v. 3, n. 2, p. 58-62, 2009.

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

KALISZ, S.; VOGLER, D. W.; HANLEY, K. M. Context-dependent autonomous self-fertilization yields reproductive assurance and mixed mating. **Nature**, London, v. 430, p. 884-887, 2004.

KAUSHIK, N.; KUMAR, K.; KUMAR, S.; KAUSHIK, N.; ROY, S. Genetic variability and divergence studies in seed traits and oil content of *Jatropha* (*Jatropha curcas* L.) accessions. **Biomass and Bioenergy**, Amsterdam, v. 31, p. 497-502, 2007.

KOCHHAR, S.; SINGH, S. P.; KOCHHAR, V. K. Effect of auxins and associated biochemical changes during clonal propagation of the biofuel plant - *Jatropha curcas*. **Biomass and Bioenergy**, Amsterdam, v. 32, p. 1136-1143, 2008.

KUMAR, R. V.; TRIPATHI, Y. K.; SHUKLA, P.; AHLAWAT, S. P.; GUPTA, V. K. Genetic diversity and relationships among germplasm of *Jatropha curcas* L. revealed by RAPDs. **Trees – Structure and Function**, Heidelberg, v. 23, n. 5, p. 1075 – 1079, 2009.

LACERDA, E. B. L.; KANASHIRO, M.; SEBBENN, A. M. Long-pollen movement and deviation of random mating in a low-density continuous population of *Hymenaea courbaril* in the Brazilian Amazon. **Biotropica**, Washington, DC, v. 40, p. 462-470, 2008. doi: 10.1111/j.1744-7429.2008.00.402.x.

LEMES, M. R.; GRIBEL, R.; PROCTOR, J.; GRATTAPAGLIA, D. Population genetic structure of mahogany (*Swietenia macrophylla* King, Meliaceae) across the Brazilian Amazon, based on variation at microsatellite loci: implications for conservation. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 12, p. 2875-2883, 2003.

LEWIS, P. O.; ZAYKIN, D. **Genetic Data Analysis**: Computer program for the analysis of allelic data. Version 1.0 (d15). 2000. Disponível em: <<http://alleyn.eeb.uconn.edu/gda/2000>> Acesso em 26 nov. 2006.

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

MODI, M. K.; REDDY, J. R. C.; RAO, B. V. S. K.; PRASAD, R. B. N. Lipase-mediated conversion of vegetable oils into biodiesel using ethyl acetate as acyl acceptor. **Bioresource Technology**, Essex, v. 98, p. 1260–1264, 2007.

MURAWASKY, D. A. Reproductive biology and genetics of tropical trees from a canopy perspective. In: LOWMAN, M. D.; NARDKARMI, N. M. **Forest canopies**. New York: Academic Press, 1995. p. 457-512.

MURAWASKY, D. A.; HAMRICK, J. C. Local genetic and clonal structure in the tropical terrestrial Bromeliad, *Aechmea Magdalenae*. **American Journal of Botany**, New York, v. 77, p. 1201-1208, 1990.

MURAWASKY, D. A.; HUBBELL, S. P.; FOSTER, R. B. Mating systems of two bombacaceous trees of a neotropical moist forest. **Oecologia**, Berlin, v. 82, p. 501–506, 1990.

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

OVANDO-MEDINA, I.; ESPINOSA-GARCÍA, F. J.; NÚÑEZ-FARFÁN, J. S.; SALVADOR-FIGUEROA, M. State of the art of genetic diversity research in *Jatropha curcas*. **Scientific Research and Essays**, Victoria Island, Lagos, v. 6, n. 8, p. 1709-1719, 2011.

- PEIXOTO, A. R. **Plantas oleaginosas arbóreas**. São Paulo: Nobel, 1973, 282 p.
- RAJU, A. J. S.; EZRADANAM, V. Pollination ecology and fruiting behaviour in a monoecious species, *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae). **Current Science**, Bangalore, v. 83, p. 1395-1398, 2002.
- RANADE, S. A.; SRIVASTAVA, A. P.; RANA, T. S.; SRIVASTAVA, J.; TULI, R. Easy assessment of diversity in *Jatropha curcas* L. plants using two single-primer amplification reaction (SPAR) methods. **Biomass and Bioenergy**, Amsterdam, v. 32, p. 533-540, 2008.
- RITLAND, K. Correlated matings in the partial selfer *Mimulus guttatus*. **Evolution**, Lancaster, v. 43, p. 848-859, 1989.
- RITLAND, K. Estimation of gene frequency and heterozygosity from pooled samples. **Molecular Ecology Notes**, New York, v. 78, p. 370-372, 2002. doi: 10.1046/j.1471-8286.2002.00182.x
- RITLAND, K.; JAIN, S. A model for the estimation of outcrossing rate and gene frequencies using independent loci. **Heredity**, London, v. 47, p. 35-52, 1981.
- ROSADO, T. B.; LAVIOLA, B. G.; FARIA, D. A.; PAPPAS, M. R.; BHERING, L. L.; QUIRINO, B.; GRATTAPAGLIA, D. Molecular markers reveal limited genetic diversity in a large germplasm collection of the biofuel crop *Jatropha curcas* L. in Brazil. **Crop Science**, Madison, v. 50, p. 2372-2382, 2010.
- SANTOS, M. J.; MACHADO, I. C.; LOPES, A. V. Biologia reprodutiva de duas espécies de *Jatropha* L. (Euphorbiaceae) em caatinga, Nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 28, p. 361-373, 2005.
- SATURNINO, H. M.; PACHECO, D. D.; KAKIDA, J.; TOMINAGA, N.; GONÇALVES, N. P. Cultura do pinhão-mansô (*Jatropha curcas* L.). **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 26, p. 44-78, 2005.
- SEBBENN, A. M. Sistema de reprodução em espécies arbóreas tropicais e suas implicações para a seleção de árvores matrizes para reflorestamentos ambientais. In: HIGA, A. R.; SILVA, L. D. (Ed.). **Pomares de sementes de espécies nativas**. Curitiba: FUPED, 2006. p. 193-198.
- SHAW, D. V.; KAHLER, A. L.; ALLARD, R. W. A multilocus estimator of mating system parameters in plant populations. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, Washington, DC, v. 78, p. 1298-1302, 1981.
- SILVA, C. R. S.; ALBUQUERQUE, P. S. B.; ERVEDOSA, F. R.; MOTA, J. W. S.; FIGUEIRA, A.; SEBBENN, A. M. Understanding the genetic diversity, spatial genetic structure and mating system at the hierarchical levels of fruits and individuals of a continuous *Theobroma cacao* population from the Brazilian. **Heredity**, London, v. 106, p. 973-985, 2011.

SILVA, R. M.; BANDEL, G.; MARTINS, P. S. Mating system in an experimental garden composed of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) ethnovarieties. **Euphytica**, Wageningen, v. 134, p. 127-135, 2003.

SORENSEN, F.C.; WHITE, T.L. Effect of natural inbreeding on variance structure in tests of wind-pollination Douglas-Fir progenies. **Forest Science**, Washington, DC, v. 34, p. 102-118, 1998.

SOUZA, L. M. I.; KAGEYAMA, P. Y.; SEBBENN, A. M. Sistema de reprodução em *Chorisia speciosa*. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 26, p. 113-121, 2003.

SUDHEER PAMIDIMARRI, D. V. N. P.; 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, p. 1357-1364, 2009.

SUDHEER, D.V.N.P.; MASTAN, S.G.; RAHMAN, H.; RAVI PRAKASH, C.; SINGH, S.; REDDY, M.P. Cross species amplification ability of novel microsatellites isolated from *Jatropha curcas* and genetic relationship with sister taxa. **Molecular Biology Reports**, Dordrecht, v. 38, p. 1383-1388, 2010.

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

VOGLER, D. W.; KALISZ, S. Sex among flowers: the distribution of plant mating systems. **Evolution**, Lancaster, v. 55, n. 1, p. 202-204, 2001.

**ANEXOS**

**Anexo A** - Relação das populações de pinhão manso (*Jatropha curcas*) utilizadas para o estudo. n – número de acessos

<b>População</b>	<b>Origem</b>	<b>Estado</b>	<b>Identificação</b>	<b>n</b>
1	Brasil	São Paulo	Lins	10
2	Brasil	São Paulo	Holambra	5
3	Brasil	São Paulo	Araras	5
4	Brasil	São Paulo	Sta Rosa	5
5	Brasil	São Paulo	Taubaté	6
6	Brasil	São Paulo	CCA/Araras	5
7	Brasil	São Paulo	Jales	5
8	Brasil	Goiás	SM Araguaia	5
9	Brasil	Goiás	Jussara	9
10	Brasil	Goiás	Itapirapuã	10
11	Brasil	Goiás	Britânia	10
12	Brasil	Goiás	MC de Goiás	10
13	Brasil	Minas Gerais	Sta Vitória	5
14	Brasil	Minas Gerais	Uberlândia	5
15	Brasil	Minas Gerais	Janaúba	9
16	Brasil	Minas Gerais	Oracila	5
17	Brasil	Minas Gerais	Paraguaçu	5
18	Brasil	Minas Gerais	Bento	5
19	Brasil	Minas Gerais	Filomena	5
20	Brasil	Mato Grosso do Sul	Torres	5
21	Brasil	Pernambuco	1	9
22	Brasil	Pernambuco	2	8
23	Brasil	Bahia	Irecê 1	7
24	Brasil	Bahia	Irecê 2	7
25	Brasil	Bahia	Cruz das Almas	5
26	Brasil	Piauí	Barras	5
27	China	-	Var. 1	7
28	China	-	Var. 2	4
29	China	-	Var. 3	8

(continua)

(conclusão)

<b>População</b>	<b>Origem</b>	<b>Estado</b>	<b>Identificação</b>	<b>n</b>
30	Camboja	-	1	11
31	Tanzânia	-	1	9
32	Rep. Dominicana	-	1	8
33	Camboja	-	2	5
34	Paraguai	-	1	3
35	Paraguai	-	2	2
36	México	-	1	2
37	México	-	2	8
38	México	-	3	7
39	México	-	4	6
40	Colômbia	-	1	10
41	Colômbia	-	2	5
42	Colômbia	-	3	5
43	Colômbia	-	4	5
44	Colômbia	-	5	5
45	Colômbia	-	6	10
46	Colômbia	-	7	10
47	Colômbia	-	8	10
48	Colômbia	-	9	10
49	Colômbia	-	10	10
50	Colômbia	-	11	10
51	Colômbia	-	12	5
			<b>Total</b>	<b>345</b>

**Anexo B** - Pares de iniciadores microssatélites específicos para pinhão manso gerados a partir da biblioteca genômica enriquecida

<b>Loco</b>	<b>Iniciadores</b>	<b>Rating</b>	<b>Alelo (pb)</b>
JCENA1	F: GACAGCCCATATAGTCAAAA	92	203
	R: ATCTTACCCATCATCATGTC	88	
JCENA2	F: AAAGTCACTGAATGGGTAAG	100	250
	R: AGTATGTGCTTCACTTGGAT	100	
JCENA3	F: CCCAATTGTGAGTGAAAAAC	83	164
	R: AAGGCAAACGTCAAGGTTA	92	
JCENA4	F: AGGGAAAAATGAAGGAGAAC	100	226
	R: GTCTGAACGTGTCAGTGTTG	87	
JCENA5	F: CAGACAAACAGGTTCTGTAA	86	154
	R: GTTGGCTTCTAAGGTTTGTA	100	
JCENA6	F: CTTAACCCGTGGCATAAC	91	243
	R: GCAAGAGGTCCTGAGTATAA	92	
JCENA7	F: GCATGTGTACCTATGCACT	80	235
	R: CATCTATCATAACGGCTTTCT	100	
JCENA8	F: AGCTATCCTGACCCTTAGAT	92	249
	R: TACTCATGCATATCACCTTC	82	
JCENA9	F: AGAGATAACAACCATCATCG	100	248
	R: AATCCAAGAAACCCTAACTC	100	
JCENA10	F: GCAAATTATAGCTCAGAAGC	88	150
	R: GAATCACCTGAATGAGTGTT	91	
JCENA11	F: CCCGTATCCAGTTAACATT	92	171
	R: TGGGGTTAGTGTCTCATAAT	92	
JCENA12	F: CATAACACAGTTCACCTCGAA	86	175
	R: ACTATCACTGCTCCACAAAT	100	
JCENA13	F: CCTGTCCAAGCTTAACTAGA	84	208
	R: ACTGGCTAATCAGAAACAAC	100	
JCENA14	F: GTCAATATCCCATCAGAAAG	86	223
	R: TCTTCATCCGATTCTCTTAC	100	

(continua)

(continuação)

Loco	Iniciadores	Rating	Alelo (pb)
JCENA15	F: ATTGGAGACGAGTTATGAGA	81	204
	R: TGTCTTATCACCACAAGTGA	87	
JCENA16	F: AGAGGTTAAGTGTGCCATAG	92	213
	R: CCATATTTCTAATCTGTGC	92	
JCENA17	F: CCAACATTCTATGCCATT	100	246
	R: AAGGCCATTTACTACATCAG	83	
JCENA18	F: CAACATGCTACCAAACCAG	91	179
	R: CTCTTAAAGGTGGTAATCCA	87	
JCENA19	F: CCTTCACTTAAATCCCAACA	92	196
	R: TCTTGAGGAGAATTTTGTGC	90	
JCENA20	F: CAGTTGCCCTTACGATATTC	90	222
	R: CAGCCATATGCAAAAAGCTA	84	
JCENA21	F: GGACAAACTACCGAGAAAAA	91	237
	R: GATAAGCTTGCCAATTTCTG	81	
JCENA22	F: CCAAAGCAAAAGAACTAGG	91	178
	R: TCCCTCACTCCTCTCTCATA	100	
JCENA23	F: GTCAACGTAGTTCGATAGGC	100	186
	R: GGTTTAAACACGGCAATATC	79	
JCENA24	F: TATAAGGGTGTGCCTCAAAT	90	157
	R: GATGTGGGTGACTTTTCAGT	91	
JCENA25	F: GCGTGGACTACATGGAAATA	87	186
	R: CAGATTGCCTAAATCATTCC	90	
JCENA26	F: GTGTGCACGCTTCTTTCTAT	93	171
	R: GGGATACCCCAAGTACTCTA	83	
JCENA27	F: CATTTTTCATCAAGGCCTAC	90	199
	R: GTATTTCTCCACACGCAACT	100	
JCENA28	F: GCTAGCTGCCACAATAAGAT	82	161
	R: GTCAAACAGTGGGTAATGCT	100	
JCENA29	F: CCTGACATTGCCGATTAAC	75	159
	R: ACCATAACCTTGAAAAACCT	98	

(continua)

(continuação)

<b>Loco</b>	<b>Iniciadores</b>	<b>Rating</b>	<b>Alelo (pb)</b>
JCENA30	F: CGTGGACTAACATGCTTTTAC	81	158
	R: CCAAATCTCAGCTTTCAAAC	88	
JCENA31	F: GATTGAGAAAACGTGTATGG	89	103
	R: ACCTCAATCACCCTTCATC	100	
JCENA32	F: CTTGTCTGATTTGTGTGTGG	90	214
	R: TGCGGACACATAGAATAACA	100	
JCENA33	F: GGTCCAGGAAAATTTAAAACC	88	224
	R: ACTCAAGCTATGCATCCAAC	82	
JCENA34	F: TAAGTGAATGTTGGTGGTGA	100	235
	R: GCCTGAACTTGAAAGACAAC	90	
JCENA35	F: GAATTCGATTCTTGCTTACG	90	170
	R: CGTGTTGAATTGAGTAGCAA	89	
JCENA36	F: CGCGTGGACTAAATCACTAT	100	167
	R: TAGGTGGGTTGGTGATATGT	91	
JCENA37	F: CCTGAAATATCCAGTTCCAA	84	191
	R: TACGCGTGGACTAACTACCT	76	
JCENA38	F: ATGGAAGATCAAAGTCAACG	81	210
	R: GTTGGATTCCACCTAGCAT	88	
JCENA39	F: CTTTCTTACCCCTCATCCTT	91	203
	R: TCCTGATGATGTGATGATGT	100	
JCENA40	F: ATTTGCTGAATAAGCTCCTG	91	191
	R: ACGCCTAATCGAATCAATC	87	
JCENA41	F: CACTTACCCCTCACTCAGAA	100	170
	R: AAAGCCAGGACATACTTGAA	91	
JCENA42	F: ATCCCCTGGTTCAGTTTAGT	88	210
	R: CTCACTACGCTGGAAAAGTC	92	
JCENA43	F: GAATTGATAAATGCCTCTGG	100	166
	R: GGAGTTTCTGTATTCCTAGCC	90	

(continua)

(continuação)

<b>Loco</b>	<b>Iniciadores</b>	<b>Rating</b>	<b>Alelo (pb)</b>
JCENA44	F: GTTGAGCTTGGAAAGTGAAG R: CCACGCTTAGTCCTAGGTAA	100 79	188
JCENA45	F: GCCCGAGTTCTCTATAAGGT R: TTGTCGTTTTCTCAAGTCAG	90 100	220
JCENA46	F: CGATAAATAGCCCAAACATC R: CGTGGACTAACCAAACAAG	87 99	172
JCENA47	F: CCAAAGCAAATGTAACCTTC R: CCAAGAGAAATTAGGAATGC	93 90	235
JCENA48	F: ATCCCTGGCAAATACAGAAT R: TGCTTTATGCATGAGTGTGT	92 81	152
JCENA49	F: AACGCAAACCACTATCACT R: CGTGGACTAACCTTTATCGT	91 100	209
JCENA50	F: GACTAGTCCCCGCGATTT R: TTATCCTAGGTGAAGGCTCA	91 80	240
JCENA51	F: TTCAGTGGGATCTTTCATTC R: TAGTTGCTCAAAGTTGTGTG	100 100	152
JCENA52	F: CATTTTTTCATCAAGGCCTAC R: GTATTTCTCCACACGCAACT	90 100	199
JCENA53	F: CTCTGGAGCTGTATGACCTC R: CCATGCCTAGATATTGGTGT	91 87	215
JCENA54	F: TGGATAGTCTGCCTGTTCTT R: GCGAAAATCGCCTAAAATC	89 80	281
JCENA55	F: CGTGGACTAACATGTCTGC R: AGCGGATAACAATTCACAC	88 90	238
JCENA56	F: GCGTGGACTAACTTGCTCTA R: GTAAAACCAAACCCAAACTG	100 100	181

(continua)

(continuação)

<b>Loco</b>	<b>Iniciadores</b>	<b>Rating</b>	<b>Alelo (pb)</b>
JCENA57	F: ATTGTGGTGGAGGCTTTAAT R: ACCAAGGATAATGCTGAGAA	85 100	230
JCENA58	F: TGGTGCTCCACAGCTACATT R: CCGTTTTCTTCTCATACCC	100 100	159
JCENA59	F: GGACTAGCAGGACAGATCAT R: TCGAGATATGATTCCGTCTC	89 85	168
JCENA60	F: CGTGGACTAACAAAAGGACT R: AAAGGCTTTCATCTGACCAA	87 90	216
JCENA61	F: GCGTGGACTATCTCAACTTC R: CGTGGACTAACAAAAGGACT	89 100	199
JCENA62	F: CGAATATTGCAGCCTACTTT R: GACTAGCAGGAAGATCATGG	100 88	197
JCENA63	F: CATGGAAATATGCTTG TAGG R: CTGATTACGCAATGGA ACTA	100 100	230
JCENA64	F: CTAAAAAGGACATGCAACC R: GCATGGATTTTCATTCTCTTC	85 90	199
JCENA65	F: CGTGGACTATCAATTTTCGT R: ATCCATCGGGCAATTCATA	90 90	152
JCENA66	F: CTGATCCTGAAAGGAATGAA R: AGCCCTACCTAACAAACCTTT	85 100	164
JCENA67	F: ACACAAGGAACCCAGAATTA R: GCTTAACTAACAAAGACGATG	90 91	235
JCENA68	F: CTATAGTGTGGAGGGGATGA R: ATTA ACTCGACCGAACTTTG	87 87	154
JCENA69	F: GTACCTGAACAATCCTCAGC R: ATGGCTCTAAAACCCTGATA	88 100	247

(continua)

(continuação)

<b>Loco</b>	<b>Iniciadores</b>	<b>Rating</b>	<b>Alelo (pb)</b>
JCENA70	F: AGAGTCGGAAGACAAAAACA	88	202
	R: GTGGACTAACTCGGTTAGAAA	85	
JCENA71	F: AATCTTAGCCCTGACCTGTT	86	191
	R: AGATGCAGTCATCGATTCTC	81	
JCENA72	F: GCGTGGACTAACTAATGCTT	100	243
	R: GCAGGATAACTGCAAGATGT	84	
JCENA73	F: GTCAACCTCTTTCGGATATG	100	211
	R: GCATAACAGAACATTGAGCA	100	
JCENA74	F: AGCCAAAGAAGATCTCATCA	100	174
	R: CGAAGATCTTTCCTCTGATG	78	
JCENA75	F: GCTTGTGCTGAGTGTGTATT	91	206
	R: GCACTATCTCGTTGAGAAGG	88	
JCENA76	F: CATCAGATGTTGACGTTTTG	85	235
	R: TTAGTGCATTGTATGCTTCG	85	
JCENA77	F: ACCTATCTCTGGCTGCAGTA	100	244
	R: GAGCGGACAAATCGTTTA	91	
JCENA78	F: AATCGTACTAGGGCTCTGTG	88	212
	R: ATAACGTCGGTGCTAACCTA	87	
JCENA79	F: TCCCACTAGATTTTCCAAAG	79	236
	R: GCCAACAAAAGATAGAGGTG	100	
JCENA80	F: GCTTACGCGTGGACTAACTA	92	221
	R: GAAATGGTCGCCTATTACAC	100	
JCENA81	F: AGGCATCTCTCCTTCTCTCT	91	165
	R: CTTGCTTAGCGTGGACTACT	93	
JCENA82	F: GGTTCTCCCTATGTGAGTGA	76	203
	R: GGCTAGATCTTCCTGTCTTCT	85	

(continua)

(continuação)

<b>Loco</b>	<b>Iniciadores</b>	<b>Rating</b>	<b>Alelo (pb)</b>
JCENA83	F: CAAAACCACAACACCCATA	99	234
	R: AACGTGCCTACGTACAGATT	82	
JCENA84	F: CTCCTCCCATCATTGAGAAG	92	160
	R: TAGTGATTTCCCAACTGGTC	89	
JCENA85	F: ATCTGGAGTGAAACCAAAGA	100	152
	R: ATTATGCACATAAGGGAGGA	81	
JCENA86	F: TTTTTCCTTCCTGTATGGAC	86	156
	R: CAAAGGTTCTTTCCCTCTCT	89	
JCENA87	F: TAAGTTCCCAGTTCCTGCTA	91	214
	R: CACATGGTAAGCATTACAAGC	90	
JCENA88	F: ACCATTCCAACAGGATGTTA	87	173
	R: GCGATGCTGCCTTTATTA	100	
JCENA89	F: GACCTTGTGTGGTAGGGTAA	91	242
	R: GGGTAAGAAGGGGTAGAGAA	100	
JCENA90	F: TACGCGTGGACTAACTACCT	87	188
	R: ATGTTTAACCGCTGACAAGT	91	
JCENA91	F: CTTACGCGTGGACTAACAAT	88	186
	R: CTTAGGCCCAAAAATTCAC	83	
JCENA92	F: TACGCGTGGACTAACTACCT	76	216
	R: GGTATGTACCAAGTTCACCA	84	
JCENA93	F: CTTACGCGTGGACTAACAAT	76	223
	R: CGGCTAATCCTTGAGTAAAA	100	
JCENA94	F: AGGCATTGGGAAACATTTAGC	91	197
	R: AATGATGAATCCAAGACAAGCC	100	
JCENA95	F: TTCATCCACACA ACTATTGCCT	91	202
	R: GGGAGTCGGTATTATTTTGGTC	100	

(continua)

(continuação)

<b>Loco</b>	<b>Motivo</b>	<b>Rating</b>	<b>Alelo (pb)</b>
JCENA96	F: CGCAGGAAAGAAAAGGAAAGA	100	319
	R: TGACAGCGTGGAAAATGTATGT	92	
JCENA97	F: ATCCCTTCAACCTTTTCAGTTC	92	148
	R: TATATCCTTTGGGGTGTGTACG	91	
JCENA98	F: GCCACTGTTTACTCCCATTCTA	100	236
	R: GGTGAAATTGATGATAAGACCC	90	
JCENA99	F: GCCACCAGATTTCTAATGCTTC	100	210
	R: AGAGGTACTTTGGGTGTGGAGA	93	
JCENA100	F: AATCAGTAACAACAAATGGGGC	100	252
	R: GGATGCGAAATGGTAGAGGATA	100	
JCENA101	F: ACCCAAACCCTAGATAAGCAT	92	371
	R: ACTCTCTCCTCCCTTCTTCGT	100	
JCENA102	F: AGTTGGATGGGAGAATTTGATG	90	186
	R: TGGGGAAAAGACCAAAATACC	98	
JCENA103	F: CCAAATAGAAAAGGCGGAGAA	100	290
	R: CGAGTTATTGTTGGTGGTCTCA	92	
JCENA104	F: AGAAGGTGAAGGAGAAGAAGGA	100	395
	R: GGCGACATAATAGGCGAAAA	100	
JCENA105	F: TATTGATTGGTGGCGTTTGA	100	313
	R: TGACATCGGAAGAATTAGTTGG	90	
JCENA106	F: AAGGACGCAGAAAGAGAAGTTG	100	254
	R: TTTCGGAGGAGATGAAGAAGAC	91	
JCENA107	F: AAACCAATCCAGAACGAGAGAA	100	319
	R: TGACAGCGTGGAAAATGTATGT	92	
JCENA108	F: GTGTGGTGCTTACCCCTATTTT	100	210
	R: GTGTGGTGCTTACCCCTATTTT	100	

(continua)

(conclusão)

<b>Loco</b>	<b>Motivo</b>	<b>Rating</b>	<b>Alelo (pb)</b>
JCENA109	F: AAACCCAAACCCTCTCTTCTTC	100	168
	R: CAGTAAAAGGTGCCAACAATGA	100	
JCENA110	F: GCGTAGAAACACAGGAACATCA	100	338
	R: ACTCTCAATGGTTGTTATGGGC	100	
JCENA111	F: AAGCCCAGTTGCTCATATTCAG	92	334
	R: CAAGGCTCAAAGATAGAAGGGA	100	
JCENA112	F: GAAGTGGATGTATGGCACTATCA	90	302
	R: ACACAAAGTGAAGCGAAACTCC	92	
JCENA113	F: CTTTTGCTTCTTTGCCTCACTT	100	298
	R: ATCTGTTTTGCCTGTGTGTACG	91	
JCENA114	F: AGATGGAGGGATGTTGAAAAGA	100	296
	R: ACTCATACTGAAAGCACCAGCA	100	
JCENA115	F: TATCAACCACATTTCCCTCCTCC	100	348
	R: GGTTATCATGGTCCGCTGTTAT	90	

**Anexo C** - Pares de iniciadores microssatélites específicos para pinhão manso que serão sintetizados e posteriormente validados

<b>Loco</b>	<b>Motivo</b>	<b>Rating</b>	<b>Alelo (pb)</b>
JCENA2	F: AAAGTCACTGAATGGGTAAG	100	250
	R: AGTATGTGCTTCACTTGGAT	100	
JCENA6	F: CTTAACCCGTGGCATAAC	91	243
	R: GCAAGAGGTCCTGAGTATAA	92	
JCENA9	F: AGAGATAACAACCATCATCG	100	248
	R: AATCCAAGAAACCTAACTC	100	
JCENA11	F: CCCGTATCCAGTTAACATT	92	171
	R: TGGGGTTAGTGTCTCATAAT	92	
JCENA16	F: AGAGGTTAAGTGTGCCATAG	92	213
	R: CCATATTTCTAATCTGTGC	92	
JCENA22	F: CCAAAGCAAAGAACTAGG	91	178
	R: TCCCTCACTCCTCTCTCATA	100	
JCENA24	F: TATAAGGGTGTGCCTCAAAT	90	157
	R: GATGTGGGTGACTTTTCAGT	91	
JCENA27	F: CATTTTTCATCAAGGCCTAC	90	199
	R: GTATTTCTCCACACGCAACT	100	
JCENA32	F: CTTGTCTGATTTGTGTGTGG	90	214
	R: TGC GGACACATAGAATAACA	100	
JCENA34	F: TAAGTGAATGTTGGTGGTGA	100	235
	R: GCCTGAACTTGAAAGACAAC	90	
JCENA35	F: TAAGTGAATGTTGGTGGTGA	100	235
	R: GCCTGAACTTGAAAGACAAC	90	
JCENA36	F: CGCGTGGACTAAATCACTAT	100	167
	R: TAGGTGGGTTGGTGATATGT	91	
JCENA39	F: CTTTCTTACCCCTCATCCTT	91	203
	R: TCCTGATGATGTGATGATGT	100	
JCENA41	F: CACTTACCCCTCACTCAGAA	100	170
	R: AAAGCCAGGACATACTTGAA	91	

(continua)

(continuação)

<b>Loco</b>	<b>Motivo</b>	<b>Rating</b>	<b>Alelo (pb)</b>
JCENA43	F: GAATTGATAAATGCCTCTGG	100	166
	R: GGAGTTTCTGTATTCACTAGCC	90	
JCENA45	F: GCCCGAGTTCTCTATAAGGT	90	220
	R: TTGTCGTTTTCTCAAGTCAG	100	
JCENA47	F: CCAAAGCAAATGTAACCTTC	93	235
	R: CCAAGAGAAATTAGGAATGC	90	
JCENA49	F: AACGCAAACCACTATCACT	91	209
	R: CGTGGACTAACCTTTATCGT	100	
JCENA51	F: TTCAGTGGGATCTTTCATTC	100	152
	R: TAGTTGCTCAAAGTTGTGTG	100	
JCENA56	F: GCGTGGACTAACTTGCTCTA	100	181
	R: GTAAAACCAAACCCAAACTG	100	
JCENA58	F: TGGTGCTCCACAGCTACATT	100	159
	R: CCGTTTTCTTCTCATACCC	100	
JCENA63	F: CATGGAAATATGCTTGTAGG	100	230
	R: CTGATTACGCAATGGAACTA	100	
JCENA65	F: CGTGGACTATCAATTTTCGT	90	152
	R: ATCCATCGGGCAATTCATA	90	
JCENA67	F: ACACAAGGAACCCAGAATTA	90	235
	R: GCTTAACTAACAAGACGATG	91	
JCENA73	F: GTCAACCTCTTTCGGATATG	100	211
	R: GCATAACAGAACATTGAGCA	100	
JCENA77	F: ACCTATCTCTGGCTGCAGTA	100	244
	R: GAGCGGACAAATCGTTTA	91	
JCENA80	F: GCTTACGCGTGGACTAACTA	92	221
	R: GAAATGGTCGCCTATTACAC	100	

(continua)

(conclusão)

<b>Loco</b>	<b>Motivo</b>	<b>Rating</b>	<b>Alelo (pb)</b>
JCENA81	F: AGGCATCTCTCCTTCTCTCT	91	165
	R: CTTGCTTAGCGTGGACTACT	93	
JCENA87	F: TAAGTTCCCAGTTCCTGCTA	91	214
	R: CACATGGTAAGCATTACAAGC	90	
JCENA89	F: GACCTTGTGTGGTAGGGTAA	91	242
	R: GGGTAAGAAGGGGTAGAGAA	100	
JCENA 100	F: AATCAGTAACAACAAATGGGGC	100	252
	R: GGATGCGAAATGGTAGAGGATA	100	
JCENA 101	F: ACCCCAAACCCTAGATAAGCAT	92	371
	R: ACTCTCTTCCTCCCTTCTTCGT	100	
JCENA 102	F: AGTTGGATGGGAGAATTTGATG	90	186
	R: TGGGGAAAAGACCAAAATACC	98	
JCENA 103	F: CCAAATAGAAAAGGCGGAGAA	100	290
	R: CGAGTTATTGTTGGTGGTCTCA	92	
JCENA 104	F: AGAAGGTGAAGGAGAAGAAGGAA	100	395
	R: GGCGACATAATAGGCGAAAA	100	
JCENA 105	F: TATTGATTGGTGGCGTTTGA	100	313
	R: TGACATCGGAAGAATTAGTTGG	90	
JCENA 106	F: AAGGACGCAGAAAGAGAAGTTG	100	256
	R: TTTCGGAGGAGATGAAGAAGAC	91	
JCENA 107	F: AAACCAATCCAGAACGAGAGAA	100	319
	R: GGAGAAAAGACCAAAATACCCC	100	
JCENA 108	F: GTGTGGTGCTTACCCCTATTTT	100	270
	R: GCCTCCTTTTCTTTTCCTGTTT	100	
JCENA 109	F: AAACCCAAACCCTCTCTTCTTC	100	168
	R: CAGTAAAAGGTGCCAACAATGA	100	
JCENA 110	F: GCGTAGAAACACAGGAACATCA	100	338
	R: ACTCTCAATGGTTGTTATGGGC	100	
JCENA 111	F: AAGCCCAGTTGCTCATATTCAG	92	334
	R: CAAGGCTCAAAGATAGAAGGGA	100	

**Anexo D** - Locos microssatélites utilizados no estudo

<b>Loco</b>	<b>Iniciadores</b>	<b>TM (°C)</b>	<b>Motivo</b>	<b>Alelo (pb)</b>
JCENA27	F: CATTTCATCAAGGCCTAC R: GTATTTCTCCACACGCAACT	54 55	(GA) <sub>12</sub>	157
JCENA41	F: CTTTCTTACCCCTCATCCTT R: AAAGCCAGGACATACTTGAA	55 55	(AC) <sub>18</sub>	170
JCENA47	F: GCCCGAGTTCTCTATAAGGT R: CCAAGAGAAATTAGGAATGC	55 54	(GT) <sub>7</sub> (GA) <sub>12</sub>	235
JCENA63	F: GCGTGGACTATCTCAACTTC R: CTGATTACGCAATGGAACTA	55 54	(GA) <sub>17</sub>	230
JCENA87	F: ATCTGGAGTGAAACCAAAGA R: CACATGGTAAGCATTACAAGC	55 56	(GT) <sub>15</sub> (GA) <sub>8</sub>	214
JCENA106	F: AAGGACGCAGAAAGAGAAGTTG R: TTTCGGAGGAGATGAAGAAGAC	60 59	(AGA) <sub>8</sub>	256
JCENA108	F: GTGTGGTGCTTACCCCTATTTT R: GCCTCCTTTTCTTTTCCTGTTT	59 60	(GAA) <sub>10</sub>	270
JCENA110	F: GCGTAGAAACACAGGAACATCA R: ACTCTCAATGGTTGTTATGGGC	60 60	(GT) <sub>14</sub>	338
JCENA111	F: AAGCCCAGTTGCTCATATTCAG R: CAAGGCTCAAAGATAGAAGGGA	60 59	(AT) <sub>6</sub> (GT) <sub>6</sub>	334

**Anexo E** - Parâmetros de diversidade genética, com base no Índice de Shannon, a partir de marcadores TRAP, avaliados para 51 populações de pinhão manso. n – número de acessos avaliados; *I* – Índice de Shannon

<b>Origem</b>	<b>Identificação</b>	<b>População</b>	<b>n</b>	<b><i>I</i></b>
Brasil	Lins-SP	1	10	0,12
Brasil	Holambra-SP	2	5	0,09
Brasil	Araras-SP	3	5	0,01
Brasil	Sta Rosa-SP	4	5	0
Brasil	Taubaté-SP	5	6	0,01
Brasil	CCA/Araras-SP	6	5	0,02
Brasil	Jales-SP	7	5	0
Brasil	SM Araguaia-GO	8	5	0,01
Brasil	Jussara-GO	9	9	0,01
Brasil	Itapirapuã-GO	10	10	0,01
Brasil	Britânia-GO	11	10	0,01
Brasil	MC de Goiás-GO	12	10	0,01
Brasil	Sta Vitória-MG	13	5	0,01
Brasil	Uberlândia-MG	14	5	0,01
Brasil	Janaúba-MG	15	9	0,01
Brasil	Oracila-MG	16	5	0,01
Brasil	Paraguaçu-MG	17	5	0
Brasil	Bento-MG	18	5	0,01
Brasil	Filomena-MG	19	5	0,01
Brasil	Torres-MS	20	5	0,01
Brasil	Pernambuco 1	21	9	0,01
Brasil	Pernambuco 2	22	8	0,01
Brasil	Irecê 1-BA	23	7	0
Brasil	Irecê 2-BA	24	7	0
Brasil	Cruz-BA	25	5	0
Brasil	Barras-PI	26	5	0
China	China-var.1	27	7	0
China	China-var.2	28	4	0
China	China-var.3	29	8	0
Camboja	Camboja1	30	11	0,01

(continua)

(continuação)

<b>Origem</b>	<b>Identificação</b>	<b>População</b>	<b>n</b>	<b>I</b>
Tanzânia	1	31	9	0
Rep. Dominicana	1	32	8	0
Camboja	Camboja2	33	5	0
Paraguai	Paraguai1	34	3	0,01
Paraguai	Paraguai2	35	2	0,02
México	México	36	2	0
México	Sada	37	8	0,13
México	Pignea	38	7	0,03
México	Miúda	39	6	0,04
Colômbia	CPM6	40	10	0,16
Colômbia	CPI5	41	5	0,02
Colômbia	CPP7	42	5	0,02
Colômbia	SPS13A	43	5	0,02
Colômbia	CPP8	44	5	0,03
Colômbia	CPPE9	45	10	0,06
Colômbia	CPPE10	46	10	0,02
Colômbia	CPS12	47	10	0,01
Colômbia	CPCM14	48	10	0,02
Colômbia	CPPE11	49	10	0,02
Colômbia	CPCC16	50	10	0,02
Colômbia	CPCC15	51	5	0,01
<b>Países</b>				
Brasil	-	-	170	0,10
China	-	-	19	0
Camboja	-	-	16	0,01
Tanzânia	-	-	9	0
Rep. Dominicana	-	-	8	0
Paraguai	-	-	5	0,03
México	-	-	23	0,13
Colômbia	-	-	95	0,17
<b>Brasil</b>				
São Paulo	-	-	41	0,12

(continua)

(conclusão)

<b>Origem</b>	<b>Identificação</b>	<b>População</b>	<b>n</b>	<b><i>I</i></b>
Goiás	-	-	44	0,08
Minas Gerais	-	-	39	0,08
Mato Grosso do Sul	-	-	5	0
Pernambuco	-	-	17	0
Bahia	-	-	19	0
Piauí	-	-	5	0