

ROMERO DE LIMA SOUSA

**VARIABILIDADE GENÉTICA EM FAMÍLIAS DE *JATROPHA CURCAS* L.
POR MARCADORES SSR**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2015

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

S725v Sousa, Romero de Lima, 1983-
2015 Variabilidade genética em famílias de *Jatropha curcas* L.
por marcadores SSR / Romero de Lima Sousa. – Viçosa, MG,
2015.

vii, 42f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Luiz Antonio dos Santos Dias.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Pinhão-manso. 2. Microsatélites (Genética).
3. Diversidade genética. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Fitotecnia. Programa de Pós-graduação em
Genética e Melhoramento. II. Título.

CDD 22. ed. 633.85

ROMERO DE LIMA SOUSA

**VARIABILIDADE GENÉTICA EM FAMÍLIAS DE *Jatropha curcas* L. POR
MARCADORES SSR**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 15 de julho de 2015.

Robson Fernando Missio

Laércio Junio da Silva

Eveline Teixeira Caixeta
(Coorientadora)

Cosme Damião Cruz
(Coorientador)

Luiz Antônio dos Santos Dias
(Orientador)

À minha mãe Maria José de Lima Sousa, pelo carinho, amor e pela saudade, quem sempre soube compreender os momentos que passamos afastados.

À minha avó Regina Henriques (in memoriam),

Aos meus amigos

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Primeiro a Deus, por estar sempre ao meu lado me guiando, não importando o momento.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV), especialmente ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, pela oportunidade da realização do Doutorado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo financiamento do projeto de pesquisa.

Aos Laboratórios de Patologia Florestal, Melhoramento de Oleaginosas, Biotecnologia do Cafeeiro e Biotecnologia e Melhoramento Vegetal, sem os quais não teria realizado minha tese.

Ao professor Luiz Antônio dos Santos Dias, por todo ensinamento passado e pela confiança na condução do projeto. Não tive apenas um orientador, mas sim um grande amigo.

A professora Eveline Caixeta por estar sempre disponível para discutirmos e sanarmos minhas dúvidas, por sempre ter uma palavra de incentivo e muita paciência para ensinar. Para mim, os marcadores moleculares não serão os mesmos depois do treinamento.

Ao professor Cosme Damião Cruz pelas valiosas sugestões, conselhos e contribuições nas análises estatísticas. Pelo exemplo de humildade e caráter a ser seguido.

Ao professor Acelino Couto Alfenas pela disponibilização do Laboratório de Patologia Florestal.

A todos amigos e amigas do Laboratório de Biotecnologia e Melhoramento Vegetal, em especial Telma, Malu, Fekadu, Geisa, Francisco e Andréa.

Aos membros da banca examinadora, professores Luiz Dias, Eveline Caixeta, Cosme Cruz, Robson Missio e Laércio Junio da Silva, pelas observações, ponderações e contribuições para a melhoria do trabalho.

A todos da equipe *Jatropha* que me acolheram com tanto carinho. Em especial a Poliane, Helida, Auxiliadora, Djair, Mari, Ricardo, Nina Rosa, Ana, Nathalia, Martha,

Ricardo e Anderson. Nosso diferencial é que somos mais que uma equipe de trabalho, somos uma família!

A todos “Parambucanos”! Vocês foram e sempre serão minha família e irmãos de coração... Manuela, Carolina, Daniela, Roberta, Glaucia, Jaíza, João Paulo, Gabriel e Flor.

Aos amigos que aqui fiz e que levarei para sempre no coração. Vários foram os momentos que passamos juntos. Fosse na alegria ou na tristeza, sempre tinha um amigo ao meu lado... Mariana, Magnago, Fábio, Gladson, Carla Nogueira, Jader, Jhonier, Lázaro, Helber, Fabiene, Zé Roxinol, Tiago Iglesias, Tulio Iglesias, Genilson, Juan, Alexssandra, Emilly, Dênia, Rose, Leticia, Dani, Marcelo, Fernanda, Afonso, Leire, Naine, Evandro, Junia Lousada, Lucas, Ricardo, Heloisa, Thais, Luana, Valéria, Nayara, Primula, Malu, Natalia, Daniela Lelis, Karla, Katia, Ronaldo, Lino Neto, Sebastián, Alice, Nakayama, Haroldo, Amilton, Tiago, ...

O meu reconhecimento e a minha gratidão a todos aqueles que, de alguma forma, auxiliaram na realização deste trabalho e no meu engrandecimento enquanto ser humano.

Muito obrigado por tudo!!!!

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. <i>Jatropha curcas</i> L.	3
2.2. Centro de origem	6
2.3. Banco de germoplasma	8
2.4. Variabilidade genética	9
2.5. Marcadores moleculares	15
2.5.1. Marcador molecular SSR	17
3. OBJETIVOS	18
4. MATERIAL E MÉTODOS	18
4.1. Coleta do material vegetal	18
4.2. Extração do DNA	21
4.3. Marcadores moleculares SSR	21
4.4. Variabilidade entre famílias	24
4.5. Análises estatísticas	24
5. RESULTADOS	25
6. DISCUSSÃO	28
7. CONCLUSÃO	31
8. REFERÊNCIAS	32

RESUMO

SOUSA, Romero de Lima, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Julho de 2015.
Variabilidade genética em famílias de *Jatropha curcas* L. por marcadores SSR
Orientador: Luiz Antônio dos Santos Dias. Coorientadores: Eveline Teixeira Caixeta e Cosme Damião Cruz.

Jatropha curcas L. é a oleaginosa perene mais promissora para produção de biodiesel e bioquerosene. Contudo, pesquisas recentes revelam estreita variabilidade genética na espécie e novos estudos nesse tema são necessários para fundamentar o seu melhoramento. O objetivo deste trabalho foi avaliar a variabilidade genética entre 93 famílias, cada qual representada por uma planta, por meio de cinco pares de marcadores SSR. Estas 93 famílias compõem o Banco Ativo de Germoplasma (BAG) da Universidade Federal de Viçosa (UFV). No total foram avaliados 60 pares de *primers* SSR, mas apenas os cinco mais polimórficos foram selecionados. Observou-se a constituição de nove grupos de diversidade pelo método UPGMA, com destaque para as famílias UFVJC 19, UFVJC 36 e UFVJC 98 que apresentaram a maior divergência genética. Pelo método de Tocher ocorreu a formação de 13 grupos, evidenciando a divergência das famílias UFVJC 18, UFVJC 36 e UFVJC 71 por suas singularidades. A variabilidade presente entre as famílias coletadas no norte de Minas Gerais suporta a hipótese da região como possível centro secundário de diversidade da espécie. Ainda que exploratória, a presente pesquisa evidenciou expressiva variabilidade genética no BAG. Este fato corrobora o acerto da estratégia de coleta das famílias do BAG-UFV, praticada com muitas plantas por família (mínimo de 16). Na implantação de outros BAGs a ênfase foi coletar maior número de acessos, porém com poucas plantas por acesso. Essa é talvez a principal razão de os estudos anteriores apontarem baixa variabilidade genética na espécie. A obtenção de novos marcadores SSR polimórficos e o processamento de análises de variabilidade dentro das famílias será a etapa seguinte da pesquisa.

ABSTRACT

SOUSA, Romero de Lima, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, June, 2015. **Genetic variability in *Jatropha curcas* L. families by using SSR markers.** Adviser: Luiz Antônio dos Santos Dias. Co-adviser: Eveline Teixeira Caixeta and Cosme Damião Cruz.

Jatropha curcas L. is the most promising perennial oilseed for biodiesel and biokerosene. However, recent research reveals narrow genetic variability in the species and further studies on this topic are needed to support its genetic improvement. We evaluated the genetic variability among 93 families, each one represented by a single plant, through five *primers* of SSR markers. These 93 families make up the genebank of the Universidade Federal de Viçosa (UFV). In total 60 SSR primer pairs were evaluated, but only the five most polymorphic were selected. There was the establishment of nine clusters of diversity by using UPGMA method. Families UFVJC 19, UFVJC 36 and 98 had the highest genetic diversity. A total of 13 clusters were formed by using Tocher method, with the families UFVJC 18, UFVJC 36 and UFVJC 71 as the most divergent. This variability among families collected in northern Minas Gerais state supported the hypothesis of the region as putative secondary center of diversity of the species. Although exploratory, the present research showed significant genetic variability in UFV genebank. This fact confirms the correctness of the collection strategy of UFV genebank families, practiced with many plants per family (minimum of 16). In the implementation of other genebanks the emphasis was to collect more accessions, but with few plants for accession. Perhaps this is the main reason previous studies suggest low genetic variability in species. Obtaining new polymorphic SSR markers and processing variability analysis within families are the next step of the research.

1. INTRODUÇÃO

O aumento considerável no consumo e a conseqüente diminuição das reservas naturais dos combustíveis fósseis, além da maior conscientização da população sobre os danos ambientais ocasionados pela utilização deles, aceleraram as buscas por alternativas viáveis que atendam a crescente demanda por combustíveis com menor impacto ambiental.

Alternativa de destaque, o biodiesel surgiu em várias partes do mundo. Na União Europeia ocorre produção deste combustível em escala industrial desde 1992. Na Alemanha, existe uma frota significativa de veículos leves, coletivos e de carga que utiliza biodiesel derivado de plantações específicas para fins energéticos e distribuído por mais de 1.000 postos de abastecimento (RAMOS et al., 2003).

No Brasil, o Governo Federal criou, em janeiro de 2005, o Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel (PNPB), com o objetivo de viabilizar a utilização do biodiesel, expandir o mercado das oleaginosas, impulsionar a demanda por combustíveis alternativos e diminuir a dependência dos combustíveis fósseis e a emissão de gases poluentes (RIBEIRO et al., 2011). Tal programa busca a inserção dos agricultores familiares na cadeia produtiva do biodiesel e por isso contempla o desenvolvimento regional e a inclusão social. Mas para viabilizá-lo por completo é necessário estimular as pesquisas com as diversas oleaginosas que serão utilizadas na fabricação do biodiesel (COSTA et al., 2013).

Matéria-prima mais atrativa para a produção de biodiesel, de segunda geração, por apresentar elevado potencial de rendimentos de grãos e óleo, *Jatropha curcas* L. tornou-se a mais promissora oleaginosa. Sua produtividade de óleo de alta qualidade para combustível pode ser três a quatro vezes superior à da soja. Esta última é a principal oleaginosa utilizada na produção de biodiesel no Brasil, respondendo por cerca de 78% (ANP, 2015).

Outro importante diferencial de *J. curcas* é a possibilidade de explorá-la em áreas degradadas como vem sendo feito na África do Sul, China, Zimbábue e na Índia (NITHIYANANTHAM et al., 2013). Srivastava et al. (2014) realizaram estudos que comprovam nitidamente que plantações desta oleaginosa melhoram significativamente a qualidade do solo podendo assim ser utilizada para produção de biodiesel e recuperação de áreas degradadas.

Apesar do potencial desta oleaginosa, o conhecimento técnico sobre seu cultivo, sua variabilidade e a arquitetura genética de suas características é extremamente limitado. *J. curcas* encontra-se em domesticação e somente nos últimos 30 anos começou a ser pesquisada agronomicamente como produtora de óleo complementar aos derivados do petróleo. Este fato corroborou para a existência de poucos programas de melhoramento da espécie, quando comparada com outras oleaginosas já estabelecidas como soja, amendoim e girassol (FREITAS et al., 2011).

Rocha et al. (2012) e Dias et al. (2007) evidenciaram as limitações técnicas ao se trabalhar com *J. curcas*. A espécie dispõe de poucos cultivares no mundo e nenhum ainda no Brasil. O desenvolvimento de cultivares brasileiros está em processo, sendo necessários mais recursos para acelerar os programas de melhoramento com a espécie.

Pesquisas relacionados com a caracterização e avaliação de germoplasma para os programas de melhoramento das diferentes culturas são fundamentais. Conhecer o grau de variabilidade genética entre e dentro da população natural, seja ele dentro ou fora do centro de origem, é fundamental para fornecimento de acessos potencialmente valiosos para tais programas. É a partir destas informações que será possível estimar o potencial do germoplasma para emprego imediato ou futuro na renovação da variabilidade que está sendo trabalhada pelo melhorista (ACHTEN et al., 2010).

O estudo da diversidade visa elucidar relações genéticas, quantificar ou prever o nível de variabilidade total existente e a sua distribuição entre e dentro de unidades taxonômicas, quer sejam indivíduos, acessos, linhagens, cultivares, populações de sistemas controlados de acasalamento ou naturais ou espécies. Este conhecimento tem proporcionado importantes contribuições ao melhoramento genético, ao gerenciamento de bancos de germoplasma, à conservação de recursos genéticos e ao entendimento dos processos evolutivos das espécies. Ao se analisar a diversidade da população-base é possível estabelecer grupos bem definidos, a partir de uma série de características, os quais servirão de base para futuros cruzamentos (SETOTAW et al., 2010; CRUZ et al., 2011).

Nos programas de melhoramento clássico, a seleção dos genótipos que apresentam características desejáveis é realizada com base nas informações fenotípicas dos indivíduos. Sabe-se que a maioria das características agronômicas são de natureza quantitativa, ou seja, controlados por um grande número de genes que sofrem elevada influência ambiental na expressão do fenótipo. A seleção fenotípica vem sendo aplicada há muito tempo, apresentando resultados bastante significativos. No entanto, nas

avaliações fenotípicas, principalmente para caracteres de baixa herdabilidade, são necessárias técnicas elaboradas de experimentação para que se tenha uma boa aproximação entre o fenótipo e o genótipo dos indivíduos. Além disso, a interação genótipo x ambiente para os caracteres de baixa herdabilidade pode dificultar os processos de seleção. Desta forma, surgem os marcadores moleculares como ferramenta de auxílio em que se leva em consideração o potencial genético do indivíduo, eliminando assim parte substancial das interferências das interações na seleção.

Algumas das vantagens dos marcadores no processo de seleção são: não sofrem influência ambiental, apresentam herança mendeliana e possuem herdabilidade igual a um, o que pode aumentar muito a eficiência do processo de seleção dos genótipos superiores (CAIXETA et al., 2013). Diversos marcadores moleculares ligados a diferentes características de importância econômica estão desenvolvidos, permitindo a seleção indireta de características desejáveis em gerações segregantes precoces. Isso reduz o tempo e os custos necessários, não só para desenvolver grandes populações segregantes por várias gerações, mas também para estimar parâmetros usados na seleção.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 *Jatropha curcas* L.

O gênero *Jatropha* deriva do grego *jatrós* (doutor) e *trophé* (comida) e possui 175 espécies distribuídas pela América Tropical, Ásia e África. *J. curcas* pertence à família Euphorbiaceae, representada por aproximadamente 72 gêneros e 1.100 espécies de diferentes hábitos e habitats (WEBSTER, 1994). Possui uma distribuição natural desde o México até o Brasil, incluindo as ilhas do Caribe (HEIFFIG & CÂMARA, 2006).

A Ásia (85%), África (13%) e América (2%) possuem as maiores áreas de cultivo de *J. curcas*, respectivamente (WWF, 2008). No Brasil, pode-se encontrá-la em estado nativo, sendo que a maior incidência ocorre nos plantios como cerca viva ou, em menor número, como fonte de óleo para uso medicinal.

Nunes (2007) relata as denominações desta oleaginosa nos diversos locais do mundo: pinhão-mansô, pinhão-branco, pinhão de purga e pinhão-paraguaio (Brasil); *physic nut*, *purging nut* (Inglês); *tempate* (Honduras e El Salvador); *médicinier*, *pignon*

d'Indi, purghere (França); *kadan* (Nepal) *yu-lu-tsu* (China); *mupuluka* (Angola); *butuje* (Nigéria) e *piñoncillo* (México).

J. curcas apresenta baixa exigência hídrica e nutricional em plantios naturais. Dependendo das condições de solo e regimes pluviométricos foram observadas produtividades de sementes variando entre 0,5 a 12 t/ha/ano (BASHA et al., 2009). Também possui precocidade na produção e baixo custo final do óleo (TEIXEIRA, 2005), possibilitando ainda a recuperação de áreas degradadas, como o projeto de combate à desertificação em Mali (HENNING, 2013).

Esta oleaginosa apresenta algumas características que favorecem o seu cultivo, tais como rusticidade, resistência ao estresse hídrico, adequação ao consórcio com outros cultivos anuais e a fácil propagação, via seminal ou clonal, além da sua utilização na recuperação de terrenos marginais, erodidos e na retenção da água no solo (DIAS et al., 2007). Sua fácil adaptação a condições climáticas muito variáveis facilita seu cultivo que se estende a diferentes tipos de solo. Apenas recomenda-se a reposição adequada de nutrientes para que não ocorra o empobrecimento do solo ao longo dos anos de cultivo (LAVIOLA & DIAS, 2008)

Laviola (2009) relata que em condições climáticas normais, o ciclo fenológico da espécie, a partir do 2º ano de plantio, obedece a seguinte ordem: em outubro, o aumento de temperatura e umidade induz o crescimento vegetativo da planta. Junto com as novas folhas e ramos ocorre o desenvolvimento de inflorescências, que florescerão a partir de novembro. Em janeiro inicia-se a produção de frutos que ocorrerá até meados de junho. Com a diminuição da temperatura e umidade por volta do mês de maio, esta oleaginosa entra em repouso vegetativo (caducifolia), com a perda das folhas, até o início de outubro quando começa a nova brotação.

Matos et al. (2012) estudaram o comportamento da senescência foliar em quatro populações silvestres de *J. curcas*, por meio da avaliação de caracteres fisiológicos. A pouca variação no comprimento do dia, a concentração adequada de nitrogênio nas folhas e o alto potencial hídrico do solo durante o experimento não foram determinantes para desencadear a senescência. Contudo, a reduzida temperatura mínima e o aumento da amplitude térmica pareceram ser determinantes para a ocorrência da senescência foliar.

J. curcas é um arbusto caducifólio e perene que pode alcançar até 5 m de altura. A semente mede de 1,5 a 2 cm de comprimento, quando seca. É ovalada, endospermica, com tegumento rijo, albúmen abundante e oleaginoso. A semente contém 7,2% de água,

37,5% de óleo, 55,3% de açúcar, amido, albuminóides e matérias minerais (ARRUDA et al., 2004).

É uma planta alógama, monóica, com flores unissexuais masculinas e femininas produzidas na mesma inflorescência, e raramente flores hermafroditas. As flores femininas estão localizadas na base das ramificações, enquanto que as masculinas estão nas pontas. Em média observa-se de 10 a 20 flores masculinas para cada flor feminina. A abertura antecipada das flores pistiladas em relação às estaminadas favorece a polinização cruzada, apesar de a espécie ser auto compatível e de polinização entomófila, principalmente por formigas, abelhas, moscas e trips (RAJU & EZRADANAM, 2002; CHANG-WEI et al., 2007; PAIVA NETO et al., 2010; BRASILEIRO et al., 2012).

Alves et al. (2008) relataram que um dos entraves na mecanização da colheita de *J. curcas* é a maturação desuniforme dos frutos ocasionada pela floração descontínua, com frutos da mesma inflorescência em idades e níveis de deiscência diferentes.

A espécie é diploide ($2n=2x=22$) (DAHMER et al., 2009), com um genoma relativamente pequeno de 0,85 pg DNA/2C com 38,7% de bases GC, distribuídas em cinco cromossomos metacêntricos e seis submetacêntricos (CARVALHO et al., 2008).

Jongschaap et al. (2007) relataram algumas formas de utilização desta oleaginosa como controle de erosão, manejo verde e lenha; os frutos servem como fertilizantes; folhas e látex apresentam uso medicinal; sementes podem ser utilizadas para produção de inseticidas; o óleo extraído da semente pode ser utilizado para produção de biodiesel, iluminação, produção de sabão, inseticida e uso medicinal; e a torta resultante da extração do óleo pode ser usada como fertilizante, para produção de biogás e ração animal quando detoxificada.

O óleo tem cerca de 83,9% do poder calorífico do óleo diesel. Quando utilizado em veículos automotivos pode gerar a mesma potência com consumo cerca de 20% maior, o ruído mais suave e a emissão de fumaça semelhante (FURLAN et al., 2006). Segundo Abdrabbo et al. (2009), o óleo possui cerca de 80% de ácidos graxos insaturados (Tabela 1), o que confere baixo ponto de solidificação do óleo (-10°C), podendo ser utilizado inclusive em regiões de clima sub-tropical. O óleo possui maior qualidade de ignição por ser menos viscoso que os óleos de dendê, babaçu e soja; no entanto, é muito mais viscoso que o diesel.

Os componentes químicos (toxialbumina jatrofina [curcina], ésteres de forbol e flavonóides) das suas sementes são utilizados no Sudeste Asiático para fins medicinais

como no tratamento do câncer, da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) e como anti-inflamatório (STAUBMANN et al., 1999, LIN et al., 2003; LUO et al., 2006).

Tabela 1. Composição percentual de ácidos graxos no óleo de *Jatropha curcas* L.

Ácidos Graxos	Óleo de <i>Jatropha curcas</i> L. (%)	
	CETEC (1983)	Abdrabbo (2009)
Ácido Palmítico	14,3	13,45
Ácido Palmitoléico	1,30	0,78
Ácido Esteárico	5,10	7,24
Ácido Oléico	41,1	47,29
Ácido Linoléico	38,1	30,68
Ácido Linolênico	0,20	0,28
Ácido Saturados	19,4	20,97
Ácido Insaturados	80,6	79,03

Fonte: Matos, F.S. (2010)

A toxidez de *J. curcas* é uma característica marcante e está relacionada à presença de fatores antinutricionais tais como a curcina (uma proteína inativadora de ribossomos que age como irritante da mucosa gastrointestinal e tem ação hemaglutinante); inibidores de tripsina (enzima necessária à boa digestão das proteínas); fitatos (classe de compostos de ocorrência natural formados durante o processo de maturação de sementes e grãos) e os ésteres de forbol. Com exceção dos ésteres de forbol, os demais agentes antinutricionais são destruídos pelo calor durante o processo de extração do óleo. Os ésteres de forbol são os principais componentes tóxicos e são derivados de diterpenos tetracíclicos, restritos às famílias Euphorbiaceae e Thymelaceae. Tais ésteres possuem atividades promotoras de tumor e inflamações (MARQUES & FERRARI, 2008). O éster de forbol é estruturalmente semelhante ao Diacilglicerol (DAG), que é um mediador secundário da inflamação. Ele pode ligar-se permanentemente à proteína quinase C, substituindo o DAG e induzindo uma resposta inflamatória grave e, em casos crônicos, levando à formação de tumores (MENDONÇA, 2009).

2.2 Centro de origem

Os estudos referentes aos Centro de Origem foram iniciados por Vavilov, entre as décadas de 1920 e 1930. Este pesquisador concluiu que grande parte da variabilidade

genética de uma espécie está presente no seu centro de origem ou centro de diversidade e, dependendo da espécie, pode ser um ou mais centros. Caso isto ocorra, a diferenciação destes é feita com base na quantidade de variabilidade observada.

Tomemos como exemplo uma determinada espécie com dois centros de diversidade comprovados. O local onde existe maior variabilidade é denominado centro primário, enquanto que o segundo é denominado de centro secundário, o qual se desenvolve a partir de tipos que migraram do centro primário. Desta forma, Vavilov considerou centros de diversidade genética como centros de origem das espécies cultivadas. Entretanto, alguns pesquisadores afirmam que nem sempre o centro de origem coincide com o centro de maior diversidade genética de uma determinada espécie

Não existia certeza quanto ao centro de origem de *J. curcas*. Muitos estudos foram feitos e nenhum foi aceito em sua totalidade pela comunidade científica. De acordo com Heller (1996), o centro de origem desta espécie é questionável, porém a América Central é tida como a mais provável. Arruda et al. (2004) afirmaram que o centro de origem fica no Brasil. Mishra (2009), Rao et al. (2008) e Ginwal et al. (2005) alegam que *J. curcas* é tropical, nativa do México e América Central, enquanto que Basha et al. (2009) incluíram as Américas do Sul e Central.

Dias et al. (2012), com base em registros históricos e conceitos genéticos, propuseram que tanto o centro de origem, quanto o de domesticação de *J. curcas*, é o México, assim como o norte de Minas Gerais é centro secundário de diversidade da espécie. Segundo esses autores, não há registros do uso de *J. curcas* e seus produtos anteriores aos Olmecas do México. Além disso, genótipos não tóxicos só existem por lá, provavelmente selecionados pelos Maias, os quais pretendiam a redução de toxicidade a fim de tornar grãos e óleo comestíveis. Pecina-Quintero et al. (2014), com base em marcadores moleculares de DNA confirmaram os relatos de Dias et al. (2012), afirmando que o México, mais precisamente Chiapas, é o centro de origem mais provável, enquanto que os estados que estão mais próximos da bacia do Golfo do México, como Vera cruz, Puebla, Hidalgo e Yucatan são os locais prováveis de domesticação, uma vez que apresentam indivíduos com ausência ou baixo teor de ésteres de forbol.

2.3 Banco de germoplasma

É o repositório do material genético das espécies de interesse, ou seja, é um banco de alelos, que são as formas alternativas dos genes, que caracterizam a existência de variabilidade genética. Estes bancos não possuem apenas a função de armazenar germoplasma, são também responsáveis pelas atividades de prospecção, coleta, introdução, intercâmbio, quarentena, caracterização, conservação, inspeção, multiplicação e regeneração do germoplasma (RAMALHO et al., 2012)

A diminuição ou perda da variabilidade genética de espécies cultivadas, seus parentes silvestres e variedades locais são preocupações dos melhoristas, uma vez que, sem elas, pode ocorrer estreitamento da base genética de determinada cultura. Tal problemática leva à uniformidade e conseqüentemente ao aumento da vulnerabilidade genética, limitando assim, a possibilidade de ganhos adicionais nos programas de melhoramento.

Em plantas perenes, a caracterização destes bancos desempenha papel preponderante por eliminar duplicatas, reduzir gastos consideráveis na manutenção, quantificar a diversidade, otimizar estratégias de amostragem pelo conhecimento dos níveis de estruturação genética, além de identificar acessos desejáveis para o programa de melhoramento genético (GOMES, 2007).

O melhoramento genético em *J. curcas* ainda não é expressivo, se comparado com outras culturas consolidadas, uma vez que muitas pesquisas básicas ainda necessitam ser realizadas para esta espécie. No entanto, grande avanço está sendo obtido com essa oleaginosa em várias partes do planeta, como na Índia (*National Botanical Research Institute* em Nova Delhi e *Jabalpur na University of Agriculture*), China, África (*Kenya Agricultural Research Institute*), América Central, Sul e Norte (Flórida (*Tropical Research and Education Center*), Hawaii e México (*Autonomous University of Chiapa*), muitas das quais mantêm bancos de germoplasma da espécie.

No Brasil, encontramos bancos de germoplasma mantidos e em pesquisa na Universidade Federal de Viçosa (UFV) em Viçosa - MG, Embrapa Agroenergia em parceria com a Embrapa Cerrado em Planaltina - DF, Universidade Federal de Sergipe (UFS) em São Cristovão - SE, Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG) em Nova Porteirinha-MG, Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) em Campinas - SP, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS) no Mato Grosso do Sul - MS e Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB) na Bahia.

A criação e manutenção de Bancos de Germoplasma em geral tem contribuído para a preservação da variabilidade genética, constituindo a “fonte genética” usada pelo melhorista para desenvolver novas cultivares (BORÉM, 2013). Vicente et al. (2005) relataram que a caracterização de germoplasma pode ser realizada por diferentes métodos, incluindo desde práticas tradicionais, que envolvem o uso de listas de descritores morfológicos e agronômicos, a aplicação bioquímica para detectar diferenças entre isoenzimas, proteínas e marcadores moleculares.

2.4 Variabilidade genética

Com as constantes mudanças na demanda de produtores, os melhoristas precisam desenvolver cultivares cada vez mais produtivas, adaptadas aos mais diversos ambientes, resistentes a pragas, doenças e pouca necessidade de insumos. O conhecimento, conservação e utilização da variabilidade genética é primordial para o sucesso de qualquer programa de melhoramento genético.

De acordo com Kageyama (1987) a variabilidade genética ou diversidade, devida a diferenças nos alelos pode ocorrer nos seguintes níveis: a) de espécies dentro de ecossistemas, b) de populações dentro de espécies e c) de indivíduos dentro de populações da espécie.

Diversidade genética pode ser definida como a quantidade de variação genética presente em uma população ou espécie, em consequência de processos evolutivos, cuja importância para a agricultura começa na conservação e aumenta com a sua utilização em programas de melhoramento para diferentes propósitos (SOUSA, 2015).

O conhecimento da diversidade genética e a relação com cultivares melhoradas é de grande importância para o melhoramento. Diversidade genética assegura medidas de proteção contra problemas futuros como pragas ou doenças e fornece base para ganhos genéticos. A uniformidade genética, dentro de uma cultura, pode ser causada pelo uso extensivo de uma ou mais cultivares estreitamente relacionadas. A hibridação entre esses tipos de cultivares resulta em base genética estreita para as novas variedades (BERTINI et al., 2006).

A quantificação da diversidade genética auxilia no planejamento de estratégias mais eficazes que venham a maximizar os ganhos no melhoramento. Dentre as possibilidades de estudos da diversidade, destacam-se: determinação das inter-relações genéticas entre linhagens, cultivares e populações; identificação de combinações parentais adequadas à obtenção de híbridos altamente heteróticos e que possibilitem

maior segregação em recombinações, com o aparecimento de transgressivos; introgressão de genes favoráveis provenientes dos acessos de bancos de germoplasma, componentes da base genética da espécie-alvo; e identificação de variedades derivadas no processo de proteção de cultivares (MOHAMMADI & PRASANNA 2003; REIF et al., 2005).

Espera-se que com os estudos da variabilidade genética dos acessos de *J. curcas*, procedentes de diferentes locais, seja formada a base para o Programa de melhoramento genético da espécie. Nessa base será possível encontrar materiais que quando comparados entre si serão ditos como superiores para aquela característica em estudo como exemplo: maior produção em quantidade e qualidade de óleo, resistência a pragas e doenças visando o melhoramento genético desta espécie. Pesquisas com *J. curcas* têm sido direcionadas para o entendimento da sua diversidade genética.

Sun et al. (2008) estudaram uma coleção de germoplasma de *J. curcas*, provenientes de diversas localidades, do Jardim Botânico do Sul da China. Eles avaliaram a diversidade genética dos 58 acessos com base nos 17 marcadores microssatélites desenvolvidos para o estudo e sete marcadores AFLP. Dos microssatélites apenas um foi polimórfico com dois alelos e dos AFLP ocorreu à amplificação de 70 locos polimórficos no total, mostrando assim a diversidade genética dos acessos de *J. curcas* em Guizhou.

Pamidimarri et al. (2008) caracterizaram variedades tóxicas e não tóxicas em *J. curcas* por meio de marcadores moleculares RAPD, AFLP e SSR. De todos os marcadores utilizados 56 RAPD e 238 AFLP apresentaram especificidade para qualquer uma das variedades, enquanto que dos 12 SSR, apenas sete foram polimórficos, com destaque para o JCMS21 que apresentou o alelo homocigoto para as plantas tóxicas demonstrando assim a viabilidade do uso dessas técnicas no estudo.

Kumar et al. (2009a) analisaram a diversidade genética entre oito espécies de *Jatropha* e três acessos de *J. curcas* por meio de nove marcadores ISSR. Foram geradas 61 bandas polimórficas, com destaque para os *primers* ISSR I1, I2, I3, I4, I5, I6, I7 e I10 por apresentarem 100% de polimorfismo. Na análise de agrupamento foram gerados três grupos distintos: um com todos os acessos de *J. curcas* (TNMJ1, TNMJ 22 e TNMJ 23), o segundo com quatro espécies (*J. tanjorensis* J. L. Ellis et Saroja., *J. gossypifolia* L., *J. podagrica* Hook e *J. maheshwarii* Subrum and M.P. Nayer) e o terceiro com os restantes (*J. villosa* Wight *J. multifida* L., *J. integerrima* Jacq and *J. glandulifera* Roxb)

Kumar et al. (2009b) analisaram a diversidade genética de 26 acessos de *J. curcas* com o auxílio de marcadores RAPD. Dentre os 55 *primers* utilizados, apenas 26 apresentaram boa amplificação, correspondendo à 30,92% das bandas consideradas polimórficas, sugerindo assim a utilização dos *primers* RAPD como ferramenta na estimativa da diversidade genética em germoplasma de *J. curcas*.

Basha & Sujatha (2009) realizaram estudo de análise genética de oito espécies e um híbrido natural de *Jatropha* provenientes da Índia. O experimento foi composto de 34 acessos de *Jatropha*, 200 marcadores RAPD, 100 ISSR e 50 SSR. Os sistemas de marcadores revelaram elevada variação genética interespecífica, com polimorfismo de 98,5%, fato este validador da nitida diferenciação morfológica das espécies utilizadas no estudo. Os *primers* SSR apresentaram polimorfismo satisfatório. Avaliação de derivados de retrocruzamentos interespecíficos envolvendo *J. curcas* e *J. integerrima* indicam possibilidades de pré-acasalamento e melhoramento genético de *J. curcas* através de hibridação interespecífica. Os marcadores RAPD e ISSR confirmaram a hibridação natural entre as espécies.

Basha et al. (2009) realizaram estudo de avaliação genética entre acessos de *J. curcas* de diferentes países. O experimento foi composto por 72 acessos de 13 países que passaram por análises moleculares e bioquímicas. Nas bioquímicas os acessos provenientes do México apresentaram variação contendo baixos níveis de ésteres de forbol. Nas moleculares, os *primers* RAPD e ISSR apresentaram polimorfismo de 61,8% e 35,5%, respectivamente. Doze *primers* microssatélites diferenciaram os acessos mexicanos não tóxicos dos tóxicos e apresentaram novos alelos no germoplasma mexicano. A estreita variação genética entre os acessos das diferentes regiões do mundo e a rica diversidade dos acessos do México indicam a necessidade de exploração de germoplasma do México em programas de melhoramento.

Rosado et al. (2010) analisaram a diversidade genética de uma coleção de germoplasma com 192 acessos de *J. curcas* coletados em diversas partes do Brasil. Foram utilizados 96 *primers* RAPD e seis SSR. Apenas 23 RAPD e um SSR apresentaram padrão polimórfico. A base genética estreita pode ser explicada pela potencial possibilidade de acessos duplicados, com ancestral comum ou a seleção intensiva feita nos materiais desde a época de sua introdução no Brasil. Esse resultado aponta para necessidade de introdução de novos acessos na coleção de germoplasma do Brasil para impulsionar e sustentar os programas de melhoramento genético.

Grativol et al. (2011) em seu estudo de diversidade genética de *J. curcas* utilizou 332 acessos de oito Estados do Brasil. Sete *primers* ISSR amplificaram um total de 21 bandas, dos quais 19 (91%) mostraram polimorfismo. Entre as bandas polimórficas 275 foram identificadas como bandas raras (presente em menos de 15% dos acessos). Análises dos marcadores ISSR como número de locos polimórficos, diversidade genética e as relações dos acessos através de UPGMA mostraram que acessos brasileiros estão intimamente relacionados, mas têm maior nível de diversidade genética de acessos de outros países, e os acessos de Natal (RN) são os mais diversos e podem ser fonte de diversidade genética em programas de melhoramento.

He et al. (2011) analisaram o éster de forbol e conteúdo curcina de sementes de *J. curcas* oriundas do México e Madagascar. Concluíram que embora ésteres de forbol estejam ausentes em sementes comestíveis, ambos os tipos contêm curcina, e o tegumento é a região de maior concentração de forbol. Já a curcina foi encontrada tanto no endosperma quanto no tegumento. Concluíram ainda que a toxicidade da semente de é uma característica monogênica que pode estar sob controle materno. Estudos de diversidade genética com marcadores AFLP foram realizados e constatou-se limitada diversidade na coleção de Madagascar, quando comparado com a do México.

Dias et al. (2012) sugeriram que o centro de origem e o centro de domesticação de *J. curcas* é o México. Eles tomaram como base evidências da antiguidade do conhecimento da espécie por povos Olmeca que viveram 3500-5000 anos. A existência de tipos não-tóxicos, que só existem naquele país, juntamente com estudos de DNA, também sugerem fortemente que o México é o centro de domesticação da espécie.

Rafii et al. (2012) utilizaram 48 acessos de *J. curcas* para analisar a diversidade genética utilizando marcadores RAPD. Oito iniciadores geraram um total de 92 fragmentos. A porcentagem de acessos polimórficos para os locais Selangor, Kelantan e Terengganu foram 80, 50 e 58% respectivamente e foram agrupados em quatro grupos.

Mastan et al. (2012) realizaram estudo para analisar a diversidade genética entre os germoplasmas elite de *J. curcas*, selecionados com base em seu desempenho no campo, utilizando marcadores RAPD, AFLP e SSR. As plantas foram selecionados com base na altura, circunferência da copa, número de sementes por fruto, peso de 100 sementes, produção de sementes em gramas por planta e teor de óleo. Foram utilizados 26 *primers* RAPD, 17 AFLP e 19 SSR. O percentual polimórfico foi 56,4 para RAPD, 57,9 para AFLP e 36,8 para SSR. Todos os marcadores apresentaram boas correlações entre si.

Destaque para diversidade observada em JCC6 (em RAPD), JCC8 (em AFLP) e JCC 6 e JCC10 (em SSR)

Danquah et al. (2012) realizaram avaliação da diversidade genética de 40 acessos representativos, retirados de 90 acessos coletados a partir de dez regiões de Gana com base em seu desempenho no rendimento das sementes. Dez *primers* RAPD revelaram um polimorfismo médio de 25% indicando diversidade genética estreita.

Medina et al. (2013) relataram estudos realizados com *J. curcas* cultivada no estado de Chiapas, México, por marcadores AFLP e SSR. *J. curcas* mexicana apresentou-se moderadamente estruturada em subpopulações, mas com alta diversidade dentro das populações. A existência de barreiras genéticas que isolaram algumas populações foram confirmadas com os dados moleculares. Os resultados são discutidos com referência à possível ascendência das populações.

Montes et al. (2014) avaliaram a estrutura genética e a diversidade em germoplasma de *J. curcas* com marcadores co-dominantes SSR e SNP em 70 acessos de vários locais do mundo. Constataram elevado nível de homozigotos no germoplasma que não corresponde ao sistema de acasalamento da espécie. Aventou-se que o sistema de acasalamento predominante em *Jatropha* é composto por um nível elevado de autofertilização e que a taxa de cruzamento é baixa. Diversidade genética em acessos da América Central e do México foi mais alta que a dos acessos da África, Ásia e América do Sul.

Ouattara et al. (2014) estudaram a diversidade genética de 103 acessos de *J. curcas*, incluindo 82 de diferentes zonas agroecológicas no Senegal e 21 exóticas. Eles foram avaliadas por meio de 33 marcadores microssatélites. Todos os marcadores amplificaram com o tamanho da banda esperado. Apenas um marcador microssatélite, JCT17 foi polimórfico mostrando três alelos e permitindo distinguir dois acessos a partir de Burkina Faso. O nível baixo da variação genética pode ser explicado pela forma de introdução de *J. curcas* no Senegal que parece ter sido feito a partir de uma ou algumas origens comuns e as espécies não recuperaram a diversidade genética, desde então, devido à propagação vegetativa. Cultivo de *J. curcas* em larga escala naquele país pode enfrentar a vulnerabilidade a pragas e exigir muitos cuidados. Sendo assim, são necessárias medidas que visem ampliar a base genética de *J. curcas* no Senegal através de novas introduções de seu centro de origem.

Figuroa et al. (2015) utilizaram marcadores SSR para estudar a diversidade genética e estrutura de populações nativas de *J. curcas* do México. Um total de 93

amostras representativas foram selecionados a partir de sete locais em duas regiões no estado de Chiapas e agrupados por proximidade geográfica. Dez pares de *primers* microssatélites foram utilizados e 27 fragmentos foram detectados (77% de polimorfismo) e indivíduos heterozigotos distinguidos. O microssatélite mais informativo foi Jcps20 (nove alelos, conteúdo índice polimórfico de 0,354). O polimorfismo médio por população foi de 58%. Os testes de Hardy-Weinberg revelaram um padrão reprodutivo de acasalamento não aleatória. Análise Bayesiana revelou que os acessos pertenciam a apenas quatro grupos genéticos e confirmaram a diferenciação entre as regiões. Por alguns locos estarem em desequilíbrio de Hardy-Weinberg, aventou-se que a diferenciação foi devido à reprodução clonal de *J. curcas* praticado por agricultores em Chiapas, junto com a dispersão antropogênica regional. Este estudo evidenciou que em Chiapas *J. curcas* tem diversidade genética maior do que a observada em outras partes do mundo, o que representa um potencial germoplasma para a seleção dos genótipos.

Sinha et al. (2015) relataram que no estudo de diversidade genética de 192 acessos coletados de 12 estados indianos e cinco outros países foram utilizados marcadores AFLP. A análise de variância molecular indicou que 59% da variação genética foi distribuída entre populações e 41% dentro. Dezesesseis acessos (8,3% da coleção) foram identificados como contendo toda a diversidade alélica de 192 acessos, no que diz respeito aos AFLP utilizados. Esses acessos mais diversos foram apontados como muito úteis para o futuro melhoramento genético de *Jatropha*.

Naresh et al. (2015) relataram em seu estudo de diversidade genética que marcadores moleculares RAPD confirmaram a variabilidade genética observada entre os acessos quanto às características morfológicas e físico-químicas analisadas, separando assim os acessos superiores entre si.

Dhakshanamoorthy et al. (2015) analisaram a diversidade genética entre mutantes obtidos a partir de diferentes doses de raio gama, por meio de 21 marcadores RAPD. Foram observados 20 *primers* polimórficos. Destacando-se o OPM 14 e OPAW 13 para a menor quantidade de bandas (três) e OPF 13 para o maior número (dez) com média geral de 4,57 bandas. A percentagem de polimorfismo variou de 0,00 a 100 com uma média de 57%. Na construção do Dendrograma com base no coeficiente de Jaccard, os mutantes foram separados em três grupos. Por este estudo concluiu-se que os marcadores RAPD são úteis para a identificação de mutantes obtidos por raio gama e plantas tratadas com EMS.

Kole et al. (2015) analisaram a variabilidade genética entre 182 acessos de *J. curcas* coletados em 19 estados indianos. Trinta *primers* RAPD rodiziram 263 bandas, sendo 254 polimórficas (96,82%). Os *primers* Oligo 905 (0,9) e OPAD 11 (0,6) apresentaram o maior e o menor valor de informação polimórfica, respectivamente, com média de 0,7. Tais resultados ratificam a viabilidade do uso de marcadores RAPD para o uso em estudos de variabilidade genética em *J. curcas*.

Bhering et al. (2015) avaliaram a diversidade entre e dentro de populações de *J. curcas*, usando marcadores SNP e DArT para traçar a melhor estratégia de seleção nessa cultura. Foram utilizadas três famílias segregantes, com 14 indivíduos, e 1495 marcadores SNP e DArT. Foram realizadas a análise de variância molecular (AMOVA), conteúdo de informação polimórfica (PIC) e métodos de agrupamento de Tocher e UPGMA. Por Tocher foram formados sete grupos. Na AMOVA a variação dentro foi superior aquela entre famílias. Seis grupos foram formados pelo UPGMA. Com base nas variâncias, os autores recomendam que nas coletas de acessos de *J. curcas* deva-se priorizar o maior número de sementes por família.

2.5 Marcadores moleculares

Os marcadores moleculares acessam o genoma e, diferentemente dos marcadores morfológicos, podem ser obtidos em grande número, não sendo afetados por fatores ambientais ou pelo estágio de desenvolvimento do vegetal. Eles são encontrados em regiões não-codificantes do DNA, sendo assim considerados seletivamente neutros (COLLARD et al., 2005). Para Milach (1998), marcadores moleculares são técnicas de DNA que diferenciam dois ou mais indivíduos e são herdados geneticamente. É definido como qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso ou de um segmento específico de DNA (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

Existem vários tipos de marcadores moleculares na literatura. Um dos maiores desafios para o pesquisador é saber qual deles melhor se aplica ao seu projeto e a sua cultura (CAIXETA et al., 2013). Cada tipo de marcador possui suas características próprias que podem ser vantajosas ou não para o tipo de estudo a ser desenvolvido (Tabela 2; COLLARD et al., 2005). Marcadores moleculares detectam polimorfismos no DNA e com base no seu método de detecção podem ser divididos em três categorias: hibridização; PCR (Polymerase Chain Reaction); e sequenciamento (GUPTA et al., 2008; JONES et al., 1997; JOSHI et al., 1999).

Tabela 2. Vantagens e desvantagens dos marcadores moleculares mais comumente usados.

Marcadores	RFLP	RAPD	AFLP	SSR	ISSR	SNP
Dominância	Codominante	Dominante	Dominante	Codominante	Dominante	Codominante
Reprodutibilidade	Média	Baixa	Alta	Alta	Alta	Alta
Dificuldade técnica	Laborioso	Simples	Laborioso	Simples	Simples	Simples
Custo	Elevado	Baixo	Elevado	Baixo	Baixo	Moderado
Automatização	Impossível	Possível	Possível	Possível	Possível	Possível
Conhecimento da sequência de DNA	Sim (Sonda)	Não	Não	Sim	Não	Sim
Quantidade de DNA	Muito	Pouco	Médio	Pouco	Pouco	Pouco
Polimorfismo	Alto	Médio	Médio	Alto	Alto	Médio

Fonte: Collard et al., (2005).

Um dos principais aspectos a ser levado em consideração em estudos de variabilidade genética é que os marcadores sejam polimórficos entre os parentais e apresentem segregação mendeliana na população em estudo. Além disso, devem ser levadas em consideração informações como custo por unidade de genotipagem, neutralidade fenotípica e abundância dos marcadores moleculares no genoma (TANKSLEY, 1993). Segundo Dudley (1993), o sucesso do marcador escolhido é dependente da disponibilidade de um grande número deles altamente polimórficos, de estreita relação de ligação entre o loco marcador e o caráter de interesse e da facilidade com que podem ser utilizados.

A avaliação precisa dos níveis e padrões de diversidade genética de espécies cultivadas por meio de marcadores moleculares pode ter diversas aplicações, como análise de variabilidade genética de cultivares, identificação de combinações de parentais para criar progênies segregantes com a máxima variabilidade genética para a seleção e introdução de genes desejáveis de germoplasma diversos dentro da base genética disponível. Marcadores moleculares podem auxiliar na escolha de cultivares a serem utilizadas em cruzamentos, de forma a ampliar as diferenças genéticas entre eles. Além disso, a análise de diversidade e distância genética por meio de marcadores moleculares pode auxiliar na ampliação da base genética da população de melhoramento (MOHAMMADI & PRASANNA, 2003).

2.5.1 Marcador molecular SSR

Os genomas eucariotos são densamente povoados por sequências simples repetidas, as quais consistem em um a seis nucleotídeos repetidos em tandem, sendo denominadas Microssatélite ou SSR (*Simple Sequence Repeats* – Sequências simples repetidas). As sequências de DNA que flanqueiam os microssatélites são geralmente conservadas entre os indivíduos de uma mesma espécie, permitindo seleção de *primers* específicos que amplificam, via PCR, fragmentos contendo o DNA repetitivo em todos os genótipos. Os produtos de amplificação são observados em gel de poliacrilamida ou em gel de agarose de alta resolução (BORÉM & CAIXETA, 2009). Em estudos de diversidade genética, marcadores SSR são potencialmente úteis, especialmente para explorar regiões altamente variáveis do genoma entre indivíduos ou populações da mesma espécie (MISSIO et al., 2010).

As sequências mais frequentes em plantas são (AT)_n, (GT)_n, e (AG)_n, enquanto que em animais repetições (AC)_n são mais comuns (KATTI et al., 2001; RAMALHO et

al., 2012). Existem estratégias para a obtenção de marcadores SSR, dentre elas a de buscar, em bancos de dados, sequências que contenham microssatélites ou buscar microssatélites numa biblioteca genômica utilizando iniciadores complementares às sequências de microssatélites (RAKOCZY-TROJANOWSKA & BOLIBOK, 2004; LENCH et al., 1996; CIFARELLI et al., 1995). A segunda estratégia é mais trabalhosa e onerosa, por demandar a criação de bibliotecas genômicas, a hibridização com oligonucleotídeos repetidos em tandem e o sequenciamento de clones candidatos. O polimorfismo detectado pelos SSRs é devido a diferenças no número de repetições nos microssatélites (RAKOCZY-TROJANOWSKA & BOLIBOK, 2004).

Os microssatélites possuem herança codominante, ou seja, é possível diferenciar homozigotos de heterozigotos. Essa característica juntamente à sua alta reprodutibilidade, pequena quantidade de DNA requerida, baixo custo, grande poder de resolução, alto nível polimórfico e a simplicidade do uso da PCR, fazem com que esse marcador seja o mais utilizado, não só no melhoramento de plantas, mas também em estudos de ecologia, biologia da conservação e filogenia (CAIXETA et al., 2009; CAIXETA et al., 2013).

3. OBJETIVO GERAL

Avaliar a variabilidade genética entre 93 famílias do Banco de Germoplasma de *Jatropha curcas* L. da Universidade Federal de Viçosa (UFV) por meio de marcadores moleculares SSR.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coleta do material vegetal

O BAG (Banco Ativo de Germoplasma) da Universidade Federal de Viçosa (UFV) está situado em Araponga-MG (latitude 20° 39' S, longitude 42° 32' W e altitude 823 m) e é constituído de acessos oriundos de diferentes regiões geográficas do Brasil (Tabela 3). O BAG está instalado em cinco experimentos, todos em blocos casualizados, com quatro repetições e parcelas de quatro plantas, utilizando o espaçamento 2x2m, com duas testemunhas comuns, totalizando 1504 plantas. Essa estratégia possibilitou a implantação de todas as 93 famílias em ensaios experimentais

com até 20 famílias cada, de fácil manejo e comparáveis entre si pela presença da testemunha comum. As testemunhas foram constituídas dos genótipos mais plantados no Brasil. As sementes que originaram estas testemunhas foram adquiridas do pioneiro produtor Nagashi Tominaga, quem produziu e distribuiu propágulos delas em todo o Brasil. As famílias foram plantadas com sementes diretamente nas covas e todos os tratamentos culturais como calagem, adubação, controle de pragas e doenças foram realizados de acordo com DIAS et al. (2007).

Tabela 3. Procedência das 93 famílias avaliadas de *Jatropha curcas* L.

Famílias	Local de coleta	Famílias	Local de coleta
UFVJC 1	Santa Vitória-MG	UFVJC 52	Barbacena-MG
UFVJC 3	Santa Vitória-MG	UFVJC 53	Barbacena-MG
UFVJC 4	Santa Vitória-MG	UFVJC 54	Barbacena-MG
UFVJC 5	João Pinheiro-MG	UFVJC 55	Janaúba-MG
UFVJC 6	João Pinheiro-MG	UFVJC 56	Janaúba-MG
UFVJC 7	João Pinheiro-MG	UFVJC 57	Janaúba-MG
UFVJC 8	João Pinheiro-MG	UFVJC 58	Janaúba-MG
UFVJC 9	João Pinheiro-MG	UFVJC 59	Janaúba-MG
UFVJC 10	João Pinheiro-MG	UFVJC 60	Pompéu-MG
UFVJC 11	João Pinheiro-MG	UFVJC 61	Rio Grande do Sul-RS
UFVJC 12	João Pinheiro-MG	UFVJC 62	Juíz de Fora-MG
UFVJC 13	Tauá-MG	UFVJC 63	Novo Repartimento-PA
UFVJC 14	Olhos D'agua-MG	UFVJC 65	Desconhecido
UFVJC 15	Veredas-MG	UFVJC 66	Desconhecido
UFVJC 16	Jaíba-MG	UFVJC 67	Desconhecido
UFVJC 17	Montalvânia-MG	UFVJC 68	São Luís-MA
UFVJC 18	Cana Brava II, Montalvânia)	UFVJC 70	Ariquemes-RO
UFVJC 19	Cana Brava II, Montalvânia)	UFVJC 71	João Pinheiro-MG
UFVJC 20	Poções-MG	UFVJC 72	Camboja
UFVJC 22	Ipatinga-MG	UFVJC 73	Camboja
UFVJC 23	Don Lara-Caratinga-MG	UFVJC 74	Camboja
UFVJC 24	Sta Luzia-Caratinga-MG	UFVJC 75	Bonfim-MG
UFVJC 25	Imbé-Caratinga-MG	UFVJC 79	Jordânia-MG
UFVJC 28	Poté-MG	UFVJC 80	Desconhecido
UFVJC 29	Poté-MG	UFVJC 81	Jordânia-MG
UFVJC 30	Poté-MG	UFVJC 82	Jordânia-MG
UFVJC 31	Poté-MG	UFVJC 83	Araras-SP
UFVJC 32	Poté-MG	UFVJC 84	Petrolina-PE
UFVJC 33	Itaipé-MG	UFVJC 85	Jataí-GO
UFVJC 34	Itaipé-MG	UFVJC 86	Jequié-BA
UFVJC 35	Ervália-MG	UFVJC 87	Jequié-BA
UFVJC 36	Serra da Ibiapaba-CE	UFVJC 88	Jequié-BA
UFVJC 37	Janaúba-MG	UFVJC 89	Jitaúna-BA
UFVJC 38	Petrolina-PE	UFVJC 90	Ipiaú-BA
UFVJC 39	Natal-RN	UFVJC 91	Apuarema-BA
UFVJC 40	Formoso-TO	UFVJC 92	Itaitê-BA
UFVJC 41	Jales-SP	UFVJC 93	Itaitê-BA
UFVJC 42	Dourados-MS	UFVJC 94	Andaraí-BA
UFVJC 43	Matozinhos-MG	UFVJC 95	Andaraí-BA
UFVJC 44	São Carlos-SP	UFVJC 96	Mucugê-BA
UFVJC 45	Barra dos Bugres-MT	UFVJC 97	Mucugê-BA
UFVJC 46	Barra dos Bugres-MT	UFVJC 98	Iraquara-BA
UFVJC 47	Pirajaí-SP	UFVJC 99	Iraquara-BA
UFVJC 48	Getulina-SP	UFVJC 100	Souto Soares-BA
UFVJC 49	Bocaiúva-MG	UFVJC 101	Wagner-BA
UFVJC 50	Bocaiúva-MG	UFVJC 102	Desconhecido
UFVJC 51	Rio Pomba-MG		

Amostras de folhas jovens e completamente desenvolvidas das 93 famílias foram coletadas, cada qual com sete sub amostras (plantas), totalizando 658 plantas. As

folhas foram envolvidas em papel alumínio, devidamente identificadas e colocadas em caixas de isopor com gelo para transporte até o Laboratório de Patologia Florestal da UFV (LPF-UFV) onde foram armazenadas à -80 °C.

4.2 Extração do DNA

O processo de extração de DNA foi realizado no LPF-UFV com base no protocolo para eucalipto, modificado de DOYLE & DOYLE (1990). Tal modificação se deu pela forma de maceração das amostras que seguiu as etapas: após a retirada das nervuras central e secundárias, as folhas foram colocadas em microtubos de 2 mL, com *beads* metálicas, juntamente com 700 µL de tampão de extração (Tris-HCl 100 mM, pH 8,0; EDTA 20 mM; NaCl 1,4 M; CTAB 2 % (p/v); PVP 2 % (p/v) e β-mercaptoetanol 0,4 % (v/v), este último separado dos demais componentes) para serem maceradas com auxílio do equipamento *Tissuelyser II* da *Qiagen*. Ao término da maceração, as amostras foram agitadas e incubadas em banho-maria a 65 °C, durante cerca de 30 minutos. Após incubação, adicionou-se 500 µL de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) aos tubos, que foram invertidos manualmente por várias vezes. Os tubos foram centrifugados a 12000 rpm por 5 min. Depois da centrifugação a fase superior (aquosa) foi recolhida e transferida para novo tubo de microcentrífuga. A extração com clorofórmio foi repetida uma vez. À fase superior (~500 µl) foi recolhida e transferida para um novo tubo de microcentrífuga, adicionou-se 0,9 volumes (450 µl) de isopropanol frio. Em seguida foram centrifugados a 12000 rpm por 15 min e descartado o isopropanol. O *pellet* resultante foi lavado por duas vezes com 500 µL de etanol frio a 70 % e uma vez a 95 %. Em seguida, os *pellets* foram colocados em temperatura ambiente para secagem por 1 hora. Após a secagem, o DNA foi ressuscitado em 50 µL de TE (Tris 10 mM e EDTA 1 mM, pH 8,0) acrescido de RNase (10 µg.mL⁻¹) por 2 horas à 37 °C e armazenados à -20 °C. A quantificação de DNA foi realizada utilizando-se espectrofotômetro *NanoDrop*, da Thermo Scientific e a concentração final ajustada para 10 ngµL⁻¹.

4.3 Marcadores moleculares SSR

Foram testados 60 pares de *primers* microssatélites desenvolvidos para *J. curcas* (Tabela 4). Nas reações de PCR foram utilizadas 50 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 MgCl₂; 0,2 µM de cada iniciador e 1 U de *Taq polymerase* (Ferramentas Life Science).

As ampliações foram realizadas em termociclador (MJ Research, PTC 100), empregando um programa com desnaturação inicial a 94 °C por 3 minutos, com uma sequência de 40 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min na temperatura específica de cada *primer*, seguida de 1 min a 72 °C e, em seguida, 8 min a 72 °C para extensão.

Os produtos de amplificação foram separados em 2 horas de eletroforese em gel de poliacrilamida, desnaturante 6X e depois corados com nitrato de prata, conforme metodologia descrita por Creste et al. (2001).

Tabela 4. *Primers* SSR utilizados na avaliação de variabilidade genética de famílias de *Jatropha curcas* L.

Nome	<i>Forward primer</i>	<i>Reverse primer</i>
¹ JCENA 27	CATTTTTCAT CAAGGCCTAC	GTATTTCTCCA CACGCAACT
¹ JCENA 41	CTTTCTTAC CCCTCATCCTT	AAAGCCAGGA CATACTTGAA
¹ JCENA 47	GCCCGAGTTC TCTATAAGGT	CCAAGAGAAA TTAGGAATGC
¹ JCENA 87	ATCTGGAGT GAAACCAAAGA	CACATGGTAAG CATTACAAGC
² JCDS 10	CATCAAATGCT AATGAAAGTACA	CACACCTAGCA AACTACTTGCA
² JCDS 24	GGATATGAAGTT TCATGGGACAAG	TTCATTGAATGGA TGGTTGTAAGG
² JCDS 41	AACACACCAT GGGCCACAGGT	TGCATGTGTGCG GGTTTGATTAC
² JCDS 58	TCCATGAAG TTTGCTGGCAAT	AGGTCATCTGGT AAAGCCATACC
² JCDS 66	CCTACGAGTGAT TGGATAGTTTCTCA	TCTTCCATCAAG AGTCGTTGGGCA
² JCPS 6	CCAGAAGTAGA ATTATAAATTA	AGCGGCTCTGA CATTATGTAC
² JCPS 9	GTA CT TAGATCT CTTGTA ACTAACAG	TATCTCTTGTT CAGAAATGGAT
² JCPS 20	ACAGCAAGTGC ACAACAATCTCA	TACTGCAGATG GATGGCATGA
² JCMS 30	GGGAAAGA GGCTCTTTGC	ATGAGTTCACAT AAAATCATGCA
³ CESR 0163	AACCACAGG AGTTGGTAATG	GAAAGAAGCA ACAGAAATGG
³ CESR 0231	GCTTTAGCA AACCAAGATTC	AATCATCGTT ATCGTTGGAC
³ CESR 0235	TGTCACAGT ACATGCCACTT	ACCTTCGATT CATTGTGTGC
³ CESR 0290	TCAATCAAT TCCAACAACAA	CTAAATTCTCA ACCAGGTGC

Tabela 4. Continuação...

³ CESR 0293	CAAAGAAGC CATTTCTGTT	TATCATCACA AAGGTGCAAA
³ CESR 0303	AAAGCCTAG TGCATTTGAAG	TCATGCTCTT TCTCCATCTT
³ CESR 0312	AAGAAACAA ACAATTGTGCC	TAGAAATCCT TGCTGGGTTA
³ CESR 0333	ACATCTACA ATGGCGATTTC	TAATGAATC TGTAGGACCCG
³ CESR 0361	AGGCAGATAT GCTGATTAAGTT	AGGCAGATATG CTGATTAAGTT
³ CESR 0370	ATCAATGAA CCTGTTGAAGG	TCCAGACTCC AAACTTAATCA
³ CESR 0382	ATGACCTACA AGCAAGCACT	CCAATGACAC CTCAGAATTT
³ CESR 0386	ATTACTGTGA ATGAAGCCCA	ACAGAGCACC CTAACGATAA
³ CESR 0398	CAATCTTATT GCAGTGCTGA	CAAACAGCTA GAATCCCTTG
³ CESR 0399	CAATGCATGG ATCATAAGTG	CTCAAGTCAA ATCTGGGAAC
³ CESR 0494	GCCAAAGCT TCTCTTAACAA	TAATCACCAT ACCCACCTTC
³ CESR 0498	GCTCGTTCA TTCATCTCACT	TTAACTGTGA ATGCCCTTCT
³ CESR 0718	ATGATGTTA AGGACGAGGTG	ATCGGCTTCT TCTTCTTCTT
³ CESR 0719	ATGATGTTAA GGACGAGGTG	GCAAGTTCTG GATTGTTCTC
³ CESR 0733	CAAACAGATCA AGTACCCAGA	AAATTGATGG TGGTGATGAT
³ CESR 0756	CAGGTTCGTC TTCTTCAACT	ATATATGATCC CGACAACAA
³ CESR 0804	CGTATTACCA CCAACATCCT	CCATCAATCC ACTTATCGTT
³ CESR 0820	CTCGAGCAC ATGTTTAATGA	TGAGATCAAT TCAACCACAA
³ CESR 0844	GAAATAGAGA CAGAAGGCGA	AAATGAACAG GGAATTGTTG
³ CESR 0889	GCTCTTGATT GATTCCATTT	TGATGATGATG ATGATGAGG
³ CESR 0934	GTTATTATC CTCGCCACTTG	TTTGTATTTG TTCACACGGA
³ CESR 1041	TTGCTGAAG CCCTTTCTAT	CAGTGTTGAGA TCATAGCGA
³ CESR 1042	TTGGATTCCC TATGAACAAC	TTTGTCTGTC GAATCCTCTC
³ CESR 1044	TTGTGGAAGC TAAGGATTTC	CCATTCTTTCT TCCTTTGTG
³ CESR 1050	TTCCACAC ATCAGCGGC	ATAAACCTTCA AACGAGCAA
³ CESR 1055	TTTGAGAGGT GGCAATAACT	GTCACAACC GGCAATTAG

Tabela 4. Continuação...

³ NS. 260	TCAGCTGTATG TTGAGTGAGCA	AGGGAAGGAAC ACCTCTCCTA
³ NS. 308	GGAAATTGGT TATGTCCTTTCC	CGCATTGGAC TTCCTACAAA
³ NS. 689	AGGATGATGATG AGACAAGAAGA	CAGACTGGACTT GAACTTTCACT
³ NS. 720	CCATTACTTAC ACATTGGACTTCCT	GGAAATTGGT TATGTCCTTTCC
³ SSRY 4	ATAGAGCAGA AGTGCAGGCG	CTAACGCACAC GACTACGGA
³ SSRY 7	TGCCTAAGGA AAATTCATTCAT	TGCTAAGCTG GTCATGCACT
³ SSRY 107	CCATTTTCTCT TGCTTCTGTCA	TGGTTTGAAGTCC TATAAAATCCTT
³ SSRY 112	CGCAAGGTAA ATCGGAGCTA	ACAATCAAAGG AGTCGTGTAATC
³ SSRY 113	TTTGCTGAC CTGCCACAATA	TCAACAATTGG ACTAAGCAGC
³ SSRY 127	CTTCGGCCTC TACAAAAGGA	GCTGAACTGC TTTGCCAACT
³ SSRY 133	AGCATGTCAT TGCACCAAAC	CGACTGCATCA GAACAATGC
³ SSRY 146	TTCCCTCGCT AGAACTTGTC	CTATTTGACCG TCTTCGCCG
³ SSRY 150	CAATGCAGGT GAAGTGAATACC	AGGGTGCTCTTC AGAGAAAGG
³ SSRY 151	AGTGGAAATA AGCCATGTGATG	CCCATAATTGATGCCAGGTT
³ SSRY 153	TTCCAGAAA GACTTCCGTTCA	CTCAACTACT GCACTGCACTC
³ SSRY 159	CTTATCCTGT CCCCTCCACC	GACAATTGCAT AGGAAGCACA
³ SSRY 177	ACCACAAAC ATAGGCACGAG	CACCCAATTCA CCAATTACCA

Referências: ¹Bressan (2012); ²Pamidimarri et al. (2008); ³Wen et al. (2010).

4.4 Variabilidade entre famílias

Para quantificar a variabilidade entre famílias foi selecionado um indivíduo, dentre os sete coletados, com base na maior concentração e melhor qualidade do DNA. Na sequência, foram selecionados os *primers* mais polimórficos para analisar a variabilidade entre as famílias.

4.5 Análises estatísticas

Dias (2006) e Cruz & Carneiro (2003) relatam que o princípio geral de todo método de agrupamento é maximizar a similaridade dentro e a dissimilaridade entre grupos. O UPGMA é um método que tem sido comumente utilizado em estudos de diversidade genética, por considerar médias aritméticas das medidas de dissimilaridade.

Isso evita caracterizar a dissimilaridade por valores extremos entre os indivíduos, como ocorre com os métodos do vizinho mais próximo e do vizinho mais distante. Outra razão que também favorece o UPGMA é que ele tende a gerar valores mais altos de CCC - coeficiente de correlação cofenética (SOKAL & ROHLF, 1962). Isso significa dizer que ele produz menor distorção quanto à representação das similaridades entre indivíduos capturada em matriz de distância e plotada em dendrograma. O CCC foi processado para avaliar a distorção do dendrograma de UPGMA. Todas as análises foram realizadas no *software* Genes (CRUZ, 2013).

Outro método de agrupamento mais comumente usado é o de otimização de Tocher que identifica o par de indivíduos mais similar, com base na matriz de dissimilaridade. Este formará o grupo inicial tendo como critério a menor distância média intragrupo, quando comparada a intergrupo, para inclusão ou não de novo indivíduo (CRUZ et al., 2013).

5. RESULTADOS

Ao todo 60 pares de *primers* SSR desenvolvidos para *J. curcas* foram avaliados no presente estudo, mas apenas cinco pares apresentaram perfil polimórfico (Tabela 5). Este estudo do polimorfismo foi realizado, no primeiro momento, escolhendo-se 12 indivíduos aleatoriamente dentre as famílias, com um representante por família. Com base neste estudo, selecionaram-se os microssatélites que apresentaram polimorfismo, os quais foram novamente avaliados com outros 24 indivíduos e, por fim, os mais polimórficos foram selecionados e aplicados a todas as 93 famílias.

Tabela 5. *Primers* SSR utilizados na avaliação da variabilidade genética entre famílias de *Jatropha curcas* L.

Nome	<i>Forward primer</i>	<i>Reverse primer</i>
¹ JCENA 87	ATCTGGAGTG AAACCAAAGA	CACATGGTAA GCATTACAAGC
² JCDS 10	CATCAAATGCT AATGAAAGTACA	CACACCTAGCA AACTACTTGCA
³ SSRY 107	CCATTTTCTC TTGCTTCTGTCA	TGGTTTGAAGTCC TATAAAATCCTT
³ SSRY 127	CTTCGGCCTC TACAAAAGGA	GCTGAACTGC TTTGCCAACT
³ CESR 0756	CAGGTTCGTC TTCTTCAACT	ATATATGATC CCGACAACAA

Referências: ¹Bressan (2012); ²Pamidimarri et al. (2008); ³Wen et al. (2010).

Os pares de *primers* selecionados detectaram indivíduos homozigotos e heterozigotos em todas as famílias, sendo JCDS 10 o mais polimórfico e JCENA 87 o menos polimórfico (Tabela 6).

Tabela 6. Número de heterozigotos, homozigotos e falhas observadas nos *pPrimers* SSR utilizados na avaliação da variabilidade genética entre 93 famílias de *Jatropha curcas* L.

Nome	Número de Heterozigotos	Número de Homozigotos	Número de Falhas
¹ JCENA 87	1	92	0
² JCDS 10	85	7	1
³ SSRY 107	78	15	0
³ SSRY 127	70	22	1
³ CESR 0756	59	32	2

Quando as 93 famílias foram agrupadas pelo método UPGMA (Figura 1) observou-se a formação de 9 grupos assim compostos: Grupo I (28 famílias), Grupo II (19 famílias), Grupo III (13 famílias), Grupo IV (6 famílias), Grupo V (9 famílias), Grupo VI (5 famílias), Grupo VII (4 famílias), Grupo VIII (6 famílias), Grupo IX (3 famílias). Destacam-se as famílias UFVJC 36, UFVJC 98 e UFVJC 19 do Grupo IX que estão localizadas em Serra da Ibiabiaba (CE), Iraquara (BA) e Montalvânia (MG), respectivamente. Os indivíduos UFVJC 72, UFVJC 73 e UFVJC 74 oriundos do Camboja foram separados em grupos diferentes. A maioria das famílias coletadas em Minas Gerais e Bahia foi reunida no Grupo I. As famílias coletadas em São Paulo (UFVJC 41, UFVJC 44, UFVJC 47, UFVJC 48 e UFVJC 83) foram separadas em grupos distintos. As famílias UFVJC 61 e UFVJC 70 coletadas no Rio Grande do Sul e Ariquemes (RO) foram coligadas no mesmo Grupo II.

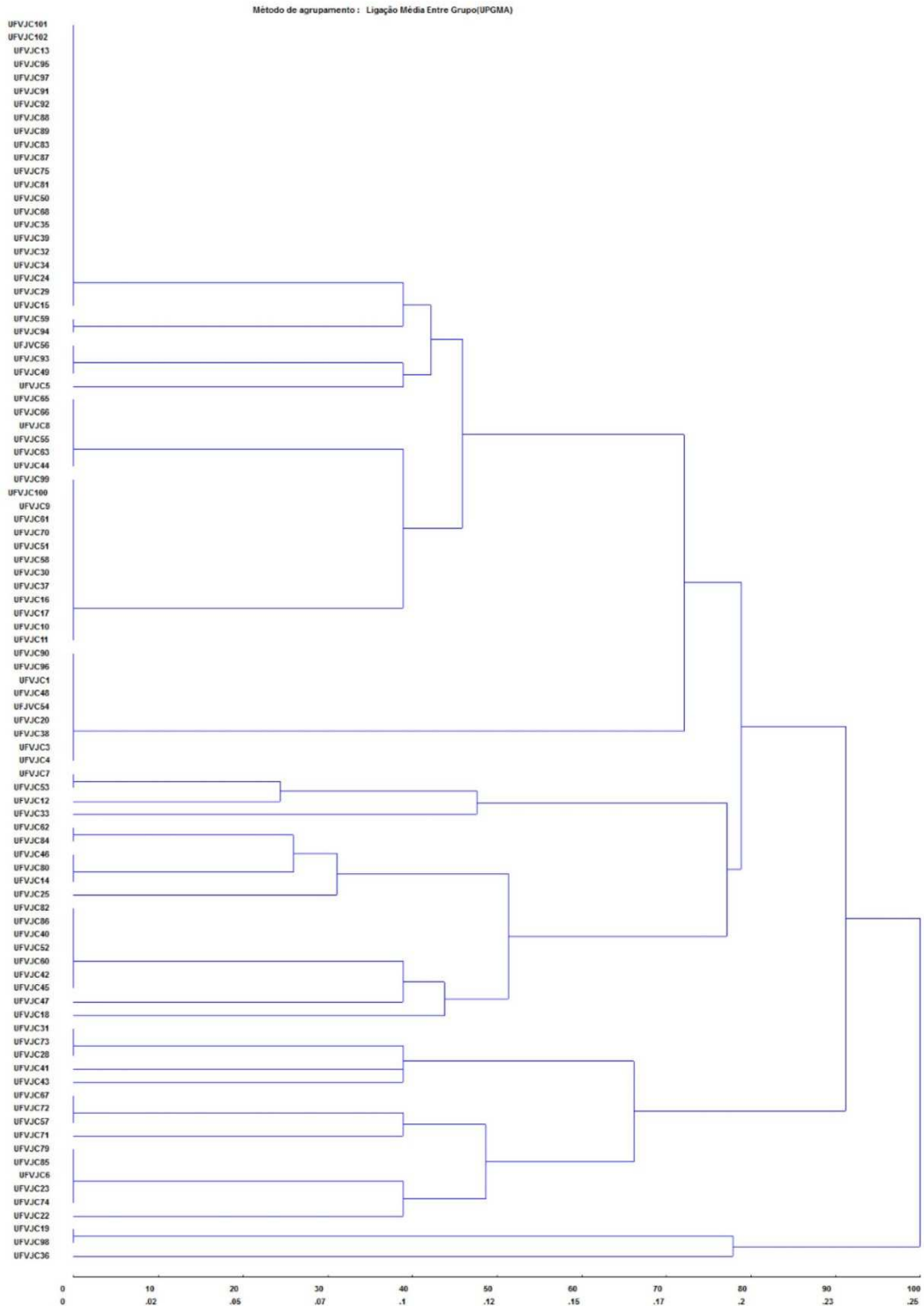


Figura 1. Dendrograma de UPGMA para 93 famílias de *Jatropha curcas* L., utilizando cinco locos de microsatélites. Destaque para as famílias UFVJC 36, UFVJC 98 e UFVJC 19, separadas das demais.

A aplicação do método de otimização de Tocher separou as famílias em 13 grupos (Tabela 7). Grupo I englobando 18 famílias, o II com 27 famílias, o III com três famílias, o IV com 14 famílias, o V com seis famílias, o VI com quatro famílias, o VII com 10 famílias, o VIII com quatro famílias, o IX e X com duas famílias cada e grupos XI, XII e XIII com uma família cada. Destaque para os indivíduos UFVJC 18, UFVJC 71 e UFVJC 36 por serem únicos em seus grupos.

Tabela 7. Agrupamento pelo método de Tocher para 93 famílias de *Jatropha curcas* L.

Grupo	Famílias
I	UFVJC1; UFVJC3; UFVJC4; UFVJC20; UFVJC38; UFVJC48; UFVJC54; UFVJC90; UFVJC96; UFVJC8; UFVJC44; UFVJC55; UFVJC63; UFVJC65; UFVJC66; UFVJC49; UFVJC56; UFVJC93.
II	UFVJC6; UFVJC23; UFVJC74; UFVJC79; UFVJC85; UFVJC13; UFVJC15; UFVJC24; UFVJC29; UFVJC32; UFVJC34; UFVJC35; UFVJC39; UFVJC50; UFVJC68; UFVJC75; UFVJC81; UFVJC83; UFVJC87; UFVJC88; UFVJC89; UFVJC91; UFVJC92; UFVJC95; UFVJC97; UFVJC101; UFVJC102.
III	UFVJC7; UFVJC12; UFVJC53.
IV	UFVJC9; UFVJC10; UFVJC11; UFVJC16; UFVJC17; UFVJC30; UFVJC37; UFVJC51; UFVJC58; UFVJC61; UFVJC70; UFVJC99; UFVJC100; UFVJC22.
V	UFVJC14; UFVJC46; UFVJC80; UFVJC25; UFVJC62; UFVJC84.
VI	UFVJC19; UFVJC98; UFVJC59; UFVJC94.
VII	UFVJC28; UFVJC31; UFVJC73; UFVJC40; UFVJC42; UFVJC45; UFVJC52; UFVJC60; UFVJC82; UFVJC86.
VIII	UFVJC57; UFVJC67; UFVJC72; UFVJC43.
IX	UFVJC5; UFVJC47.
X	UFVJC33; UFVJC41.
XI	UFVJC18
XII	UFVJC71
XIII	UFVJC36

6. DISCUSSÃO

Diversos estudos estão sendo feitos com intuito de investigar a variabilidade genética de *J. curcas* e na maior parte deles observa-se que existe reduzida variabilidade nos acessos amostrados. Essa realidade é um fator limitante para os programas de melhoramento, uma vez que é através da exploração da variabilidade que o melhorista consegue melhorar as espécies para alimentação humana e animal.

Os baixos níveis de diversidade genética em *J. curcas* têm sido relatados na literatura e estão sendo atribuídos a diferentes causas como forma de dispersão das espécies nativas pelos continentes (HELLER, 1996), distribuição geográfica feita por propagação vegetativa (BASHA & SUJATHA, 2007), germoplasma com limitadas

introduções (BASHA et al., 2009), ancestralia comum e seleção intensiva dos materiais cultivados no Brasil desde a época de introdução (ROSADO et al., 2010).

O BAG da UFV é bem representativo e composto por indivíduos de diversas partes do Brasil, além de acessos do Camboja. A realização de estudos que comprovem ou não a existência de variabilidade nesse banco é de fundamental importância para o desenvolvimento do programa de melhoramento da cultura em questão. Freitas et al. (2011), analisando as sementes das plantas matrizes que deram origem ao BAG-UFV, encontraram teor médio de óleo de 31%, com ampla variação de 16% a 45%.

O principal foco do programa de melhoramento de *J. curcas* da UFV é a seleção das melhores plantas quanto a produtividade de óleo para a produção de biodiesel. Sabendo disso, Freitas (no prelo) selecionou, com base no valor genotípico, as 20 melhores famílias do BAG-UFV quanto a produtividade de óleo. Neste trabalho foi possível constatar o potencial genético deste BAG, uma vez que a predição de ganho genético, ao utilizar essas famílias, resultará num adicional de 47.9% de produtividade de óleo. Ao considerar os 20 melhores indivíduos selecionados pelo valor genético aditivo (sementes) observou-se um adicional de 157,0% de produtividade de óleo.

A escolha dos genitores para a formação da população base é de fundamental importância. Sendo assim, a correta e precisa caracterização dos acessos do banco é primordial para que se consiga detectar e explorar a característica desejável (BHERING et al. 2011). A seleção inicial de genótipos divergentes superiores quanto à produção de grãos e óleo, aumenta a chance de seleção de combinações gênicas superiores, já nas primeiras gerações, em razão da concentração de alelos favoráveis (LAVIOLA et al., 2010; JUHÁSZ et al., 2013).

Uma ferramenta muito útil para se avaliar essa divergência entre os acessos são os marcadores moleculares. Desta forma, neste estudo, os cinco locos SSR polimórficos foram utilizados nas 93 famílias de *J. curcas*. Todos eles foram capazes de detectar considerável nível de heterozigotos. De fato, alguns estudos (SUN et al., 2008; ROSADO et al., 2010; WEN et al., 2010) revelam essa alta heterozigosidade que pode ser explicada de a *J. curcas* ser uma espécie monóica. Desta forma, espera-se que os locos estejam em heterozigose devido a alogamia.

As famílias que apresentaram maior divergência genética, por meio dos métodos UPGMA e Tocher, foram UFVJC 18 e UFVJC 19, coletados em Montalvânia (MG), além da UFVJC 36, UFVJC 98 e UFVJC 71 recolhidas, respectivamente, em Serra da Ibiabiaba (CE), Iraquara (BA) e João Pinheiro (MG). A maior variabilidade presente nas

famílias coletadas em Minas Gerais ratifica a hipótese de Dias et al. (2012) que consideram o norte do estado como centro secundário de *J. curcas*.

Ao se analisar a formação dos grupos pelo método do UPGMA e Tocher, apesar deste estudo ser exploratório, fica evidente alta variabilidade presente no BAG-UFV, se comparado com estudos realizados em outros bancos de germoplasma pelo mundo. Sun et al. (2008), em avaliação da diversidade genética de 58 acessos de *J. curcas* do banco de germoplasma do *South China Botanical Garden*, utilizaram 30 microssatélites, 17 deles polimórficos, e encontraram limitada diversidade neste banco. Rosado et al. (2010) analisaram a diversidade de 192 acessos por meio de marcadores RAPD e seis marcadores SSR encontrando baixa variabilidade entre os acessos. Na-ek et al. (2011) avaliaram 32 indivíduos provenientes de diferentes regiões do mundo com cinco SSR e registraram limitada diversidade genética. Salvador Figueroa et al. (2015), estudando 93 acessos coletados em sete locais de duas regiões de Chiapas no México, utilizaram 10 pares de SSR e constataram que tais acessos de *J. curcas* possuem diversidade maior que a observada em outras partes do mundo, com potencial para compor banco de germoplasma e programas de melhoramento. Naresh et al. (2015) avaliaram a diversidade genética entre 14 acessos da Índia com o auxílio de 10 marcadores RAPD e observaram baixa variabilidade entre os acessos.

A estratégia de coleta das famílias do BAG-UFV foi certamente o diferencial deste banco. Tal estratégia, preconizada por Dias & Kageyama (1991), privilegiou a coleta de maior número de sementes de cada família, visando capturar maior quantidade de variação genética dentro delas. Dias & Kageyama (1991) relatam que o conhecimento do nível de variação genética e a sua distribuição entre e dentro de populações é fundamental. Com ele é possível o melhor direcionamento das estratégias de melhoramento a serem adotadas de forma à maximizar os ganhos genéticos através dos ciclos de seleção. Em *J. curcas* alguns estudos detectaram maior quantidade de variabilidade genética dentro de populações (PIOTO et al., 2015; SINHA et al., 2015; MAURYA et al., 2015; BHERING et al., 2015). Essa alta concentração da variação genética dentro de populações implica em se amostrar mais plantas por família (Dias & Kageyama, 1991); Bhering et al., 2015).

O presente resultado atesta o acerto do processo de coleta do BAG - UFV, em que cada família foi representada por 16 plantas. Ao mesmo tempo, este resultado serve de alerta para outros BAGs que se preocuparam em coletar maior número de acessos,

porém, com poucas plantas por acesso. Essa é talvez a principal razão de os estudos anteriores com marcadores de DNA apontarem baixa variabilidade genética na espécie.

7. CONCLUSÃO

Constatou-se a existência de expressiva variabilidade genética entre as 93 famílias do BAG – UFV, por meio dos cinco *primers* SSR. Este foi um primeiro estudo de caráter mais exploratório da potencialidade do banco. Para maior conhecimento do banco o trabalho terá sequência com a obtenção de maior número de marcadores polimórficos e o estudo de variabilidade dentro das famílias.

Recomenda-se estudos mais detalhados com as famílias UFVJC 18, 19, 36, 71 e 98, por apresentarem elevada divergência genética e por isso promissoras para o programa de melhoramento.

8. REFERÊNCIAS

- ABDRABBO, A.; ABOU KHEIRA.; NAHED, M.M. Response of *Jatropha curcas* L. to water deficits: yield, water use efficiency and oilseed characteristics. **Biomass and Bioenergy**, v.33, p.1343–1350, 2009.
- ACHTEN, W.M.J.; NIELSEN, L.R.; AERTS, R.; LENGKEEK. A.G.; KJAER, E.D.; TRABUCCO, A.; HANSEN, J.K.; MAES, W.H.; GRAUDAL, L.; AKINNIFESI, F.K.; MUYS, B. Towards domestication of *Jatropha curcas*. **Biofuels**, v. 1, p. 91-107, 2010.
- ALVES, J.M.A.; SOUSA, A.A.; SILVA, S.R.G.; LOPES, G.N.; SMIDERLE, O.J.; UCHÔA, S.C.P. Pinhão-Manso: Uma Alternativa para Produção de Biodiesel na Agricultura Familiar da Amazônia Brasileira. **Agroambiente On-line**, v.2, n.1, p.57-68, jan-jun. 2008.
- ANP (2015) Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. **Boletim Mensal do Biodiesel**, Maio de 2015. Disponível em <<http://www.anp.gov.br>>. Acesso em: 22 de Junho de 2015.
- ARRUDA, F.P.; BELTRÃO, N.E.M.; ANDRADE, A.P.; PEREIRA, W.E.; SEVERINO, L.S. Cultivo de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) como alternativa para o semi-árido nordestino. **Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibrosas**. v.8, n.1, p. 789-799, jan-abr. 2004.
- BASHA, S.D.; FRANCIS, G.; MAKKAR, H.P.S.; BECKER, K.; SUJATHA, M.A comparative study of biochemical traits and molecular markers for assessment of genetic relationships between *Jatropha curcas* L. germplasm from different countries. **Plant Science**, v.176, p.812-823, 2009.
- BASHA, S.D.; SUJATHA, M. Genetic analysis of *Jatropha* species and interspecific hybrids of *Jatropha curcas* using nuclear and organelle specific markers. **Euphytica**, v.168, p.197-214, 2009.
- BASHA, S.D.; SUJATHA, M. Inter and intra-population variability of *Jatropha curcas* (L.) characterized by RAPD and ISSR markers and development of population-specific SCAR markers. **Euphytica**, v.156, p.375-386, 2007.
- BERTINI, C.H.C.M.; SCHUSTER, I.; SEDIYAMA, T.; BARROS. E.G.; MOREIRA, M.A. Characterization and genetic diversity analysis of cotton cultivars using microsatellites. **Genetics and Molecular Biology**, v.29, p.321-329, 2006.

- BHERING, L. L.; CRUZ, C. D.; LAVIOLA, B. G. Biometria aplicada ao melhoramento de espécies alternativas para produção de biodiesel. In: CARDOSO, D. L.; LUZ, L. N.; PEREIRA, T. N. S. (Ed.). **Estratégias em melhoramento de plantas**. Viçosa, MG: Arka, 2011, p. 89-119.
- BHERING, L.L.; PEIXOTO, L.A.; LEITE, N.L.S.F.; LAVIOLA, B.G. Molecular analysis reveals new strategy for data collection in order to explore variability in *Jatropha*. **Industrial Crops and Products**, v.74, p.898-902, 2015.
- BÓREM, A. & CAIXETA, E.T. (Editores). **Marcadores moleculares**. Viçosa: Editora Folha de Viçosa, 2009. 532p.
- BORÉM, A. **Melhoramento de Plantas**. 6ªed. Viçosa: UFV, 2013, 523p.
- BRASILEIRO, B.G.; DIAS, D.C.F.D.S.; BHERING, M.C.; DIAS, L.A.S. Floral biology and characterization of seed germination in physic nut (*Jatropha curcas* L.). **Revista Brasileira de Sementes**, v.34, n.4, p.556-560, 2012.
- BRESSAN, E.D.A.; SCOTTON, D.C.; FERREIRA, R.R.; JORGE, E.C.; SEBBENN, A.M.; GERALD, L.T.; FIGUEIRA, A. Development of microsatellite *primers* for *Jatropha curcas* (Euphorbiaceae) and transferability to congeners. **American journal of botany**, v.99, n.6, p.237-239, 2012.
- CAIXETA, E.T.; FERRÃO, L.F.V.; MACIEL-ZAMBOLIM, E. Marcadores moleculares. In: BORÉM, A.; FRITSCHÉ-NETO, R. (Org.). **Biotecnologia aplicada ao melhoramento de plantas**. Visconde do Rio Branco: Suprema, 2013. p. 31-68.
- CAIXETA, E.T.; OLIVEIRA, A.C.B.; BRITO, G.G.; SAKIYAMA, N.S. Tipos de marcadores moleculares. In: BORÉM, A.; CAIXETA, E.T. (Org.). **Marcadores moleculares**. Viçosa: UFV, 2009. p. 11-94.
- CARVALHO, C.R.; CLARINDO, W.R.; PRAÇA, M.M.; ARAÚJO, F.S.; CARELS, N. Genome size, base composition and karyotype of *Jatropha curcas* L., an important biofuel plant. **Plant Science**, v.174, p.613-617, 2008.
- CHANG-WEI, L.; KUN, L.; YOU, C.; YONG-YU, S. Floral display and breeding system of *Jatropha curcas* L. **Forestry Studies in China**, v.9, p.114-119, 2007.
- CIFARELLI, R.A.; GALLITELLI, M.; CELLINI, F. Random amplified hybridization microsatellites (RAHM): isolation of a new class of microsatellite containing DNA clones. **Nucleic Acid Research**, v.23, p.3802-3803, 1995.
- COLLARD, B.C.Y.; JAHUFER, M.Z.Z.; BROUWER, J.B.; PANG, E.C.K. An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted

- selection for crop improvement: The basic concepts. **Euphytica**, v.142, p.169-196, 2005.
- COSTA, V.L.; KOVALESKI, J.L.; JUNIOR, P.P.A; COSTA, D.L.; MORSCHEL, E.L. Transferência de tecnologia na produção de biodiesel: alternativa para inclusão social e desenvolvimento regional no Estado do Paraná. **Revista Brasileira de Gestão e Desenvolvimento Regional**, v.9, n.1, p.17-39, 2013.
- CRESTE, S.; TULMANN NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.19, p.299-306, 2001.
- CRUZ, C.D. GENES - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum**. v.35, n.3, p.271-276, 2013.
- CRUZ, C.D.; CARNEIRO, P.C.S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Volume 2. Viçosa: UFV, 2003. 623p.
- CRUZ, C.D.; FERREIRA, F.M.; PESSONI, L.A. **Biometria aplicada ao estudo da diversidade genética**. Viçosa: Editora Suprema, 2011, 620p.
- CRUZ, C.D.; SALGADO, C.C; BHERING, L.L. Biometria aplicada à análise molecular em diversidade genética. In: BOREM, A.; FRITSCHÉ-NETO, R. **Biotecnologia aplicada ao melhoramento de plantas**. Suprema, Rio Branco. p. 69-118. 2013.
- DAHMER, N.; WITTMANN, M.T.S.; DIAS, L.A.S. Chromosome numbers of *Jatropha curcas* L.: an important agrofuel plant. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.9, p.386-389, 2009.
- DANQUAH, E.O.; AKROMAH, R.; QUASHIE-SAM, S.J.; ODURO, W.; FALK, D.; THEVATHASAN, N.V.; GORDON, A. M. The genetic diversity of *Jatropha curcas* (L.) germplasm in Ghana as revealed by random amplified polymorphic DNA (RAPD) *primers*. **Agroforestry systems**, v.86, n.3, p.443-450, 2012.
- DHAKSHANAMOORTHY, D.; SELVARAJ, R.; CHIDAMBARAM, A. Utility of RAPD marker for genetic diversity analysis in gamma rays and ethyl methane sulphonate (EMS)-treated *Jatropha curcas* plants. **Comptes rendus biologies**, v.338, n.2, p.75-82, 2015.
- DIAS, L.A.S. Análises Multidimensionais. In: ALFENAS, A.C. **Eletroforese e marcadores bioquímicos em plantas e microrganismos**. Editora UFV, Viçosa. p. 405-475. 2006.

- DIAS, L.A.S.; KAGEYAMA, P.Y. Variação genética em espécies arbóreas e consequências para o melhoramento florestal. **Agrotropica**, v.3, n.3, p. 119-127, 1991
- DIAS, L.A.S.; LEME, L.P.; LAVIOLA, B.G.; PALLINI, A.; PEREIRA, O.L.; DIAS, D.C.F.S.; CARVALHO, M.; MANFIO, C.E.; SANTOS, A.S.; SOUSA, L.C.A.; OLIVEIRA, T.S.; PRETTI, L.A. **Cultivo de pinhão-manso (*Jatropha curcas*)**. Suprema, Viçosa, 2007. 40p.
- DIAS, L.A.S.; MISSIO, R.F.; DIAS, D.C.F.S. Antiquity, botany, origin and domestication of *Jatropha curcas* (Euphorbiaceae), a plant species with potential for biodiesel production. **Genetics and Molecular Research**, v.11, p.2719-2728, 2012.
- DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.12, p.13-15, 1990.
- DUDLEY, J. W. Molecular markers in plant improvement: manipulation of genes affecting quantitative traits. **Crop Sciences**, v.33, p.660-668, 1993.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPLAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análises genéticas**. 3. ed. Brasília, DF: EMBRAPA-CERNAGEN, 1998. 220p.
- FIGUEROA, M.S.; RAMOS, J.M.; VAZQUEZ, J.A.O.; ANAYA, M.L.A.; MEDINA, I.O. Genetic diversity and structure of *Jatropha curcas* L. in its centre of origin. **Plant Genetic Resources**, v.13, n.01, p.9-17, 2015.
- FREITAS, R.G.; MISSIO, R.F.; MATOS, F.S.; RESENDE, M.D.V.; DIAS, L.A.S. Genetic evaluation of *Jatropha curcas*: an important oilseed for biodiesel production. **Genetics and Molecular Research**, v. 10, n. 3, p. 1490-1498, 2011.
- FREITAS, R.G.; DIAS, L.A.S.; CARDOSO, P.M.R.; EVARISTO, A.B.; SILVA, M.F.; ARAÚJO, N.M. Diversity and genetic parameter estimates for yield and its components in *Jatropha curcas* L. **Genetics and Molecular Research**. No prelo.
- FURLAN, J.; KALTNER, F.J.; AZEVEDO, G.F.P.; CAMPOS, I.A. **Cultivo do Pinhão Manso**. In Biodiesel 1ª Ed, Belém, 134-150, 2006
- GINWAL, H.S.; PHARTYAL, S.S.; RAWAT, P.S.; SRIVASTAVA, R.L. Seed source variation in morphology, germination and seedling growth of *Jatropha curcas* Linn. in Central India. **Silvae Genetica**, v. 54, p. 76-80, 2005.

- GOMES D.M.; **Variabilidade fenotípica de caracteres vegetativos e reprodutivos em populações de pupunheira (*Bactris gasipaes Kunth*)**. 2007, 72p. Dissertação (Mestrado). Instituto Agronômico de Campinas (IAC), Campinas, São Paulo.
- GRATIVOL, C.; LIRA-MEDEIROS, C.F.; HEMERLY, A.S.; FERREIRA, P.C.G. High efficiency and reliability of inter-simple sequence repeats (ISSR) markers for evaluation of genetic diversity in Brazilian cultivated *Jatropha curcas* L. accessions. **Molecular biology reports**, v.38, n.7, p.4245-4256, 2011.
- GUPTA, S.; SRIVASTAVA, M.; MISHRA, G.P.; NAIK, P.K.; CHAUHAN, R.S.; TIWARI, S.K.; KUMAR, M.; SINGH, R. Analogy of ISSR and RAPD markers for comparative analysis of genetic diversity among different *Jatropha curcas* genotypes. **African Journal of Biotechnology**, v.7, p.4230-4243, dez. 2008.
- HE, W.; KING, A.J.; KHAN, M.A.; CUEVAS, J.A.; RAMIARAMANANA, D.; GRAHAM, I.A. Analysis of seed phorbol-ester and curcin content together with genetic diversity in multiple provenances of *Jatropha curcas* L. from Madagascar and Mexico. **Plant physiology and biochemistry**, v.49, n.10, p.1183-1190, 2011.
- HEIFFIG, L.S.; CÂMARA, G.M.S. Potencial da cultura do pinhão-mansão como fonte de matéria-prima para o Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel. In: CÂMARA, G.M.S.; HEIFFIG, L.S. (Org.). **Agronegócio de plantas oleaginosas: matérias-primas para biodiesel**. Piracicaba: ESAL, 2006. p.105-121.
- HELLER J. **Physic nut (*Jatropha curcas*): promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops**. Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Rome, 1996. 66p.
- HENNING, R.K. **Combating desertification: the *Jatropha* project of Mali, West Africa**. Disponível em: <http://ag.arizona.edu/oals/ALN/aln40/Jatropha.html>. Acesso em: 10 fev. 2013.
- JONES, N.; OUGHAM, N.; THOMAS, H. Markers and mapping: We are all geneticists now. **New Phytologist**, v.137, p.165–177, 1997.
- JONGSCHAAP, R.E.E.; CORRÉ, W.J.; BINDRABAN, P.S.; BRANDENBURG, W.A. **Claims and Facts on *Jatropha curcas* L. Global *Jatropha curcas* evaluation, breeding and propagation programme**. Holanda, out. 2007. Disponível em: <<http://www.ifad.org/events/Jatropha/breeding/claims.pdf>>. Acesso em: 14 mar. 2015.

- JOSHI, S.; RANJEKAR; P.RANJEKAR, P.; GUPTA; V.GUPTA, V. Molecular markers in plant genome plant analysis genome analysis. **Current Science**, v.77, p.230–240, 1999.
- JUHÁSZ, A. C. P.; RESENDE, M. D. V.; LAVIOLA, B. G.; COSTA, M. R. Melhoramento genético de *Jatropha curcas*: considerações e metodologias. In: RESENDE JCF, LONDE LN, NEVES WS (Ed.) **Pinhão-manso**. Nova Porteirinha: Epamig - Capítulo em livro técnico-científico (ALICE), 2013, cap. 89-152, p. 524.
- KAGEYAMA, P.Y. Conservação “in situ” de recursos genéticos de plantas. **Silvicultura**, São Paulo, v. 11, n. 41, p. 7-37, 1987.
- KATTI, M.V.; RANJEKAR, P.K.; GUPTA, V.S. Differential distribution of simple sequence repeats in repeats eukaryotic in genome eukaryotic sequences genome sequences. **Molecular Biology and Evolution**, v.18, n.7, p.1161-1167, 2001.
- KOLE, P.R.; BHAT, K.V.; CHAUDHURY, R.; MALIK, S.K. Genetic variation among *Jatropha curcas* L. using dominant molecular marker collected from different agro-climatic regions of India. **Indian Journal of Genetics and Plant Breeding**, v.75, n.2, p.267-270, 2015.
- KUMAR, R.S.; PARTHIBAN, K.T.; RAO, M.G. Molecular characterization of *Jatropha* genetic resources through inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. **Molecular Biology Report**, v.36, p.1951-1956, 2009a.
- KUMAR, R.V.; TRIPATHI, Y.K.; HUKLA, P.; AHLAWAT, S.P.; GUPTA, V.K. Genetic diversity and relationships among germplasm of *Jatropha curcas* L. revealed by RAPDs. **Trees**, v.23, p.1075-1079, 2009b.
- LAVIOLA, B. G. Recursos genéticos e melhoramento de Pinhão Manso. In: I CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISA EM PINHÃO MANSO, 2009, Brasília. **Anais eletrônicos do I Congresso Brasileiro de Pesquisa em Pinhão Manso**. Brasília, 2009.
- LAVIOLA, B. G.; ROCHA, J. D.; KOBAYASHI, A. K.; ROSADO, T. B.; BHERING, L. L. Genetic improvement of *Jatropha* for biodiesel production. **Ceiba**, v. 51, p. 1-10, 2010.
- LAVIOLA, B.G.; DIAS, L.A.S. Teor e acúmulo de nutrientes em folhas e frutos de pinhão- manso. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v. 32, p.1969-1975, 2008.
- LENCH, N.J.; NORRIS, A.; BAILEY, A.; BOOTH, A.; MARKHAM, A.F. Vettorette PCR isolation of microsatellite repeat sequences using anchored dinucleotide repeat primers. **Nucleic Acids Research**, v.24, p.2190–2191, 1996.

- LIN, J.; YAN, F.; TANG, L.; CHEN, F. Antitumor effects of curcin from seeds of *Jatropha curcas*. **Acta Pharmacologica Sinica**, Beijing, v. 24, n. 3, p. 241-246, 2003.
- LUO, M.J.; YANG, X.Y.; LIU, W.X.; XU, Y.; HUANG, P.; YAN, F.; CHEN, F.; Expression, purification and anti-tumor activity of curcin. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, Shanghai, v. 38, n. 9, p. 663-668, 2006.
- MARQUES, D.A.; FERRARI, R.A. O papel das novas biotecnologias no melhoramento genético do pinhão manso. **Biológico**, v.70, p.65-67, 2008.
- MASTAN, S.G.; SUDHEER, P.D.; RAHMAN, H.; GHOSH, A.; RATHORE, M.S.; PRAKASH, C.R.; CHIKARA, J. Molecular characterization of intra-population variability of *Jatropha curcas* L. using DNA based molecular markers. **Molecular biology reports**, v.39, n.4, p.4383-4390, 2012.
- MATOS, F.S.; OLIVERIA, L.R.; FREITAS, R.G.; EVARISTO, A.B.; MISSIO, R.F.; CANO, M.A.O.; DIAS, L.A.S. Physiological characterization of leaf senescence of *Jatropha curcas* L. populations. **Biomass and Bioenergy**, v.45, p.57-64, 2012.
- MAURYA, R.; GUPTA, A.; SINGH, S.K.; RAI, K.M.; KATIYAR, R.; SAWANT, S.V.; YADAV, H. K. Genomic-derived microsatellite markers for diversity analysis in *Jatropha curcas*. **Trees**, v.29, n.3, p.849-858, 2015.
- MEDINA, I.O.; ANAYA, L.A.; OVANDO, A.V.; GONZÁLEZ, S.R.; RABANALES, M.R.; FIGUEROA, M.S.; Genetic diversity of *Jatropha curcas* in Southern Mexico. In *Jatropha, challenges for a new energy crop*. New York: Springer, 2013. P. 216-250.
- MENDONÇA, S. Co-produtos de Pinhão Manso (*Jatropha curcas* L.). In: I CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISA EM PINHÃO MANSO, 2009, Brasília. **Anais eletrônicos do I Congresso Brasileiro de Pesquisa em Pinhão Manso**. Brasília, 2009.
- MILACH, S.C.K. (Editor). **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre, 1998. 141 p.
- MISHRA, D.K. Selection of candidate plus phenotypes of *Jatropha curcas* L. using method of paired comparisons. **Biomass and Bioenergy**, v. 33, p. 542-545, 2009.
- MISSIO, R.F.; CAIXETA, E.T.; ZAMBOLIM, E.M.; ZAMBOLIM, L.; CRUZ, C.D.; SAKIYAMA, N.S. Polymorphic information content of SSR markers for *Coffea* spp. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.10, p.89-94, 2010.

- MOHAMMADI, S.A.; PRASANNA, B.M. Analysis of genetic diversity in crop plants – Salient statistical tools and considerations. **Crop Science**, v.43, p.1235-1248, 2003.
- MONTES, J.M.; TECHNOW, F.; MARTIN, M.; BECKER, K. Genetic Diversity in *Jatropha curcas* L. Assessed with SSR and SNP Markers. **Diversity**, 6, n.3, p.551-566, 2014.
- NA-EK, Y.; WONGKAEW, A.; PHUMICHAJ, T.; KONGSIRI, N.; KAVEETA, R.; PHUMICHAJ, C. Genetic diversity of physic nut (*Jatropha curcas* L.) revealed by SSR markers. **Journal of Crop Science and Biotechnology**, v.14, n.2, p.105-110, 2011.
- NARESH, B.; MEDIPALLY, S.R.; DHANASRI, G.; DEVI, P. Genetic Diversity of *Jatropha curcas* L. accessions and screening for high Biodiesel production. **Int. J. Pure App. Biosci**, v.3, n.1, p.124-135, 2015.
- NITHIYANANTHAM, S.; SIDDHURAJU, P.; FRANCIS, G. A promising approach to enhance the total phenolic content and antioxidant activity of raw and processed *Jatropha curcas* L. kernel meal extracts. **Industrial Crops and Products**, v.43, p.261-269, 2013.
- NUNES, C. F. **Caracterização de frutos, sementes e plântulas e cultivo de embriões de Pinhão manso (*Jatropha curcas* L.)**. 2007. 78f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2007.
- OUATTARA, B.; NDIR, K.N.; GUEYE, M.C.; DIÉDHIOU, I.; BARNAUD, A.; FONCEKA, D.; CISSÉ, N.; AKPO, E.L.; DIOUF, D. Genetic diversity of *Jatropha curcas* L. in Senegal compared with exotic accessions based on microsatellite markers. **Genetic resources and crop evolution**, v.61, n.6, p.1039-1045, 2014.
- PAIVA NETO, V.B.; BRENHA, J.A.M.; FREITAS, F.B.; ZUFFO, M.C.R.; ALVAREZ, R.C.F.A. Aspectos da biologia reprodutiva de *Jatropha curcas* L. **Ciência e Agrotecnologia**, v.34, p.558-563, 2010.
- 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 Reporter**. v.36, p.1357-1364, 2008.
- PECINA-QUINTERO, V.; ANAYA-LÓPEZ, J. L.; ZAMARRIPA-COLMENERO, A.; NÚÑEZ-COLÍN, C. A.; MONTES-GARCÍA, N.; SOLÍS-BONILLA, J. L.;

- JIMÉNEZ-BECERRIL, M. F. Genetic structure of *Jatropha curcas* L. in Mexico and probable centre of origin. **Biomass and Bioenergy**, v.60, p.147-155, 2014.
- PIOTO, F.; COSTA, R.S.; FRANÇA, S.C.; GAVIOLI, E.A.; BERTONI, B.W.; ZINGARETTI, S.M. Genetic diversity by AFLP analysis within *Jatropha curcas* L. populations in the State of São Paulo, Brazil. **Biomass and Bioenergy**, v.80, p.316-320, 2015.
- RAFII, M.Y.; SHABANIMOFRAD, M.; EDAROYATI, M.P.; LATIF, M.A. Analysis of the genetic diversity of physic nut, *Jatropha curcas* L. accessions using RAPD markers. **Molecular biology reports**, v.39, n.6, p.6505-6511, 2012.
- RAJU, A.J.S.; EZRADANAM, V. Pollination ecology and fruiting behaviour in a monoecious species, *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae). **Current Science**, v.83, n.11, p.1395-1398, dez. 2002
- RAKOCZY-TROJANOWSKA, M; BOLIBOK, H. Characteristics and a comparison of three classes of microsatellite-based markers and their application in plants. **Cellular & Molecular Biology Letters**, v.9, p.221-238, 2004.
- RAMALHO, M.A.P.; SANTOS, J.B.; PINTO, C.A.B.P.; SOUZA, E.A.; GONÇALVES, F.M.A.; SOUZA, J.C. **Genética na agropecuária**. Lavras: UFLA, 2012. 565 p
- RAMOS, L.P.; KUCEK, K.T.; DOMINGOS, A.K.; WILHELM, H.M. Biodiesel: Um projeto de sustentabilidade econômica e sócio-ambiental para o Brasil. **Biociência, Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, n. 31, p. 28-37, 2003.
- RAO, G.R.; KORWAR, G.R.; SHANKER, A.K.; RAMAKRISHNA, Y.S. Genetic associations, variability and diversity in seed characters, growth, reproductive phenology and yield in *Jatropha curcas* L. accessions. **Trees**, v.22, p.697-709, 2008.
- REIF, J.C.; MELCHINGER, A.E.; FRISCH, M. Genetical and mathematical properties of similarity and dissimilarity coefficients applied in plant breeding and seed bank management. **Crop Science**, Madison, v. 45, p. 1-7. 2005.
- RIBEIRO, R.M.; DIAS, L.A.S.; BERGER, P.G.; DIAS, D.C.F.S. **Agroenergia na mitigação das mudanças climáticas globais, na segurança energética e na promoção social**. Viçosa: Editora Suprema, 2011, 201p.
- ROCHA, R.B.; RAMALHO, A.R.; TEIXEIRA, A.L.; LAVIOLA, B.G.; SILVA, F.C.G.; MILITÃO, J.S.L.T. Eficiência da seleção para incremento do teor de óleo do pinhão-mansão. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 47, p.44-50, 2012.

- ROSADO, T.;B.; LAVIOLA, B.G.; FARIA, D.A.; PAPPAS, M.R.; BHERING, L.L.; QUIRINO, B.; GRATAPAGLIA, D. Molecular markers reveal limited genetic diversity in a large germplasm collection of the biofuel crop *Jatropha curcas* L. in Brazil. **Crop Science**, v.50, p.2372–2382, 2010.
- SALVADOR-FIGUEROA, M.; MAGANA-RAMOS, J.; VAZQUEZ-OVANDO, J.A.; ADRIANO-ANAYA, M.L.; OVANDO-MEDINA, I. Genetic diversity and structure of *Jatropha curcas* L. in its centre of origin. **Plant Genetic Resources**, v.13, n.01, p.9-17, 2015.
- SETOTAW, T.A.; DIAS, L.A.S.; MISSIO, R.F. Genetic divergence among barley accessions from Ethiopia. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.10, p.116-123, 2010.
- SINHA, P.; ISLAM, M.A.; NEGI, M.S.; TRIPATHI, S.B. First identification of core accessions of *Jatropha curcas* from India based on molecular genetic diversity. **Plant Genetic Resources**, p.1-4, 2015.
- SOKAL, R.R.; ROHLF, F.J. The comparison of dendrograms by objective methods. **Taxon**, v.11, p.30-40, 1962.
- SOUSA, N. R. PROCESSOS GENÉTICO-EVOLUTIVOS E OS RECURSOS FITOGENÉTICOS. *Disponível em: <https://www.inpa.gov.br/cpca/charles/pdf/NSousa_Cap1.pdf>. Acesso em: 22 julho 2015.*
- SRIVASTAVA, P.; SHARMA, Y.K.; SINGH, N. Soil carbon sequestration potential of *Jatropha curcas* L. growing in varying soil conditions. **Ecological Engineering**, v.68, p.155-166, 2014.
- STAUBMANN, R.; NCUBE, I.; GUBITZ, G.M.; STEINER, W.; READ, J.S. Esterase and lipase activity in *Jatropha curcas* L. **Journal Biotechnology**, v. 75, p.117-126, 1999.
- SUN, Q.; LI, L.; LI, Y.; WU, G.; GE, X. SSR and AFLP Markers Reveal Low Genetic Diversity in the Biofuel Plant *Jatropha curcas* in China. **Crop Science**, v.48, p.1865-1871, 2008.
- TANKSLEY, S. D. 1993. Mapping polygenes. **Annual Review of Genetics**, v.27, p.205-233.
- TEIXEIRA, L.C. Produção de biodiesel. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.26, n.229, p.79-86, 2005.

- VICENTE, M.C.; GUZMÁN, F.A.; ENGLÉS, J.; RAMANATHA, R.A.O.V.; Genetic characterization and its use in decision making for the conservation of crop germplasm. **The Role of Biotechnology**. v.5, n.7, p.121-128. 2005.
- WEBSTER, G.L. Euphorbiaceae. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, Saint Louis, v. 81, p. 1-144, 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**, v.3, n.1, p.42, 2010.
- WWF. **Global Market study on *Jatropha***. London: GEXSI LLP, 2008. 60 p.