

ERIKA DA COSTA FERNANDES

**VARIABILIDADE GENÉTICA ENTRE E DENTRO DE FAMÍLIAS DE
JATROPHA CURCAS L.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, para a obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2017

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

T

F363v
2017
Fernandes, Erika da Costa, 19-
Variabilidade genética entre e dentro de famílias de
Jatropha curcas L. / Erika da Costa Fernandes. – Viçosa, MG,
2017.
vii, 27f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Luiz Antonio dos Santos Dias.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f.21-27.

1. Pinhão-mansô. 2. Diversidade genética.
3. Germoplasma. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Fitotecnia. Programa de Pós-graduação em
Fitotecnia. II. Título.

CDD 22 ed. 633.85

ERIKA DA COSTA FERNANDES

**VARIABILIDADE GENÉTICA ENTRE E DENTRO DE FAMÍLIAS DE
*JATROPHA CURCAS L.***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, para a obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 27 de julho de 2017.



José Baldin Pinheiro



Thais Roseli Corrêa



Eveline Teixeira Caixeta
(Coorientadora)



Luiz Antônio dos Santos Dias
(Orientador)

*“Conhecer é recordar a verdade que já
existe em nós, é despertar a razão para
que ela se exerça por si mesma.”*

Platão.

A Deus e à minha querida mãe por todo amor e confiança.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pois sem ele nada seria. Agradeço a Ele por todos os lugares que me enviou e pelas oportunidades a mim oferecidas.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV) e ao Programa de Pós- Graduação em Fitotecnia pela oportunidade e pelo ensino de excelência.

Ao conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento e pela bolsa de estudos.

Aos laboratórios de Biotecnologia e Melhoramento Vegetal e Biotecnologia do Cafeeiro pela estrutura sem as quais não seria possível realizar este trabalho.

Ao Prof. Luiz Antônio dos Santos Dias, pela orientação, paciência, apoio e todo ensinamento que me foi ofertado.

ADra. Eveline Teixeira Caixeta, pela coorientação, por ter me acolhido como uma de suas alunas, todas as sugestões, disponibilidade, paciência e todo ensinamento proporcionado.

Ao Prof. José Baldin Pinheiro pela disponibilidade de participação da banca e por todas as considerações.

À Thais Roseli Corrêa por todo apoio e sugestões.

Ao Tiago Vieira Sousa por todo auxílio e paciência com as análises estatísticas.

À minha mãe que sempre está ao meu lado, me apoiando e incentivando, por acreditar mais em mim do que eu mesma. Aos meus irmãos João Paulo e Rafael e a minha família, por todo amor e carinho. Ao meu padrasto, por me ensinar o que é o amor de pai, pela preocupação e confiança. Ao Wilton Jordan pelo carinho e confiança.

Aos anjinhos que a UFV me trouxe, Dandara e Rosângela, pela amizade verdadeira e duradoura. As minhas amigas e amigos, antigos e recentes em especial Micaela, Carla, Pietro, Ciene, Wellingson, Maiara, Camila, Mariane, Flávia, Rebeca, Leticia e Renata por todo apoio, incentivo e por tornarem essa experiência melhor.

Ao pessoal do laboratório BioCafé por toda paciência e auxílio.

Ao Grupo de Pesquisa em Agroenergia, pela cumplicidade e experiência.

Ao pessoal do Grupo de Pesquisa em Soja, por todos os momentos de estudo, trabalho e também pela diversão.

Enfim agradeço a todos que me auxiliaram e apoiaram neste período. E aqueles que de alguma forma me ajudaram a chegar até aqui.

Muito Obrigada, de coração!

SUMÁRIO

RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO	1
2. MATERIAL E MÉTODOS	4
2.1. Coleta do material	4
2.2. Extração do DNA.....	5
2.3. Marcadores microssatélites (SSRs).....	6
2.4. Análise dos dados.....	7
2.4.1. Diversidade entre e dentro de famílias.....	7
2.4.2. Diversidade entre famílias.....	10
3. RESULTADOS.....	10
4. DISCUSSÃO	16
5. CONCLUSÕES	21
REFERÊNCIAS	22

RESUMO

FERNANDES, Erika da Costa. M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2017. **Variabilidade genética entre e dentro de famílias de *Jatropha curcas* L.** Orientador: Luiz Antônio dos Santos Dias. Coorientadora: Eveline Teixeira Caixeta.

Jatropha curcas L. é uma espécie vegetal oleaginosa de grande potencial para produção de biocombustíveis, devido ao elevado teor de óleo de suas sementes. Porém, há escassez de cultivares comerciais e programas de melhoramento para esta espécie são raros. Estudos apontam que a espécie apresenta estreita variabilidade genética, sendo necessárias pesquisas que esclareçam essa problemática. O objetivo deste estudo foi avaliar a variabilidade genética entre e dentro de 28 famílias do Banco Ativo de Germoplasma de *J. curcas* da Universidade Federal de Viçosa (BAG-UFV) por meio de marcadores moleculares microssatélites (SSRs). Foram testados 39 pares de *primers* SSRs, dos quais seis foram polimórficos, totalizando 18 alelos com média de três alelos/locos. Estes seis marcadores permitiram estimar a variabilidade genética entre e dentro das famílias. O conteúdo de informação de polimorfismo variou de 0,08 a 0,57, com média de 0,36, indicando moderada informatividade dos *primers*. As heterozigosidades esperada (H_e) e observada (H_o) foram elevadas (0,44 e 0,48, respectivamente). O coeficiente de endogamia (f) foi baixo (-0,03) e a variabilidade entre e dentro das famílias, com base no índice de Shannon-Wiener (H'), foi considerada alta ($H'=0,71$). O agrupamento de todos os acessos revelou a formação de 11 grupos. A análise bayesiana classificou as famílias em quatro grupos gênicos. A análise de variância molecular revelou que a maior parte da variabilidade (92,4%) está contida dentro das famílias. Por fim, o valor de Φ_{ST} (0,07) indicou expressiva diferenciação entre as famílias. Em razão destes resultados recomenda-se priorizar a seleção de genótipos dentro das famílias, pois é onde se encontra maior variabilidade. Estes resultados corroboram com a estratégia utilizada na implantação do BAG, que priorizou a coleta de mais plantas por família, reunindo de forma eficiente maior variabilidade genética no BAG-UFV.

ABSTRACT

FERNANDES, Erika da Costa. M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2017. **Genetic variability within and between families of *Jatropha curcas* L.** Adviser: Luiz Antônio dos Santos Dias. Co-adviser: Eveline Teixeira Caixeta.

Jatropha curcas L. is an oilseed plant with great potential for biofuels, due to high oil content in their seeds. However, there are no commercial cultivars available and breeding programs for this species are rare. Recent research indicate narrow genetic variability outside its center of diversity, further studies on this topic are necessary to clarify this problem and to develop new cultivars. Thus, the aim of this study was characterize the genetic variability among and within 28 families from *Jatropha curcas* L. Germplasm Bank of Universidade Federal de Viçosa (BAG) using SSR markers. A total of 39 SSR primer pairs were tested, that six were polymorphic, totaling 18 alleles with a mean of three alleles/locos. These six markers allowed estimating genetic variability among and within families, through statistics of diversity. Polymorphic information content value ranged from 0.08 to 0.57 with an average of 0.36 indicating moderate level of informativeness of these primers. High expected heterozygosity ($H_e=0.44$) and observed heterozygosity ($H_o=0.48$) were identified. Inbreeding coefficient ($f=-0.03$) is considerate low and high variability between and within families with the Shannon's information index ($H'=0.71$). A cluster analysis with all accessions revealed 11 groups. Bayesian analysis ranking the accessions into four genetic groups. Analysis of molecular variance revealed that the greatest variation (92.4%) occurs within families. Finally, the value of Φ_{ST} (0.07) indicated an expressive differentiation between families. Therefore, we recommend prioritizing the selection of genotypes within the lines, since it is where greater variability is found. These results corroborate with the strategy used in the implementation of UFV genebank families, practiced with the collection of many plants per family, efficiently bringing together greater genetic variability to BAG-UFV.

1. INTRODUÇÃO

Jatropha curcas L., popularmente conhecida como pinhão manso, é uma espécie vegetal da família Euphorbiaceae, de hábito arbustivo e composta por diversas ramificações e que pode atingir 5 m de altura. É uma planta caducifolia, diploide ($2n=22$), com inflorescências compostas de flores unissexuais femininas, masculinas e, eventualmente, hermafroditas (DIAS et al., 2007; DIAS et al., 2012). Apresenta sistema de reprodução misto, com formação de sementes ocorrendo preferencialmente por meio de cruzamentos. A taxa de autofecundação na espécie varia de 10 a 30% (BRESSAN et al., 2013; ALVES et al., 2015). Os frutos possuem, em média, três sementes e o amadurecimento é desuniforme (DIAS et al., 2007).

É uma espécie de grande valor social e ecológico, recomendada para a recuperação de áreas degradadas, devido a sua ampla distribuição e alta tolerância a ambientes marginais e condições de estresse (FRANCIS et al., 2005; CEASAR& IGNACIMUTHU, 2011; MONTES et al., 2014; LAVIOLA et al., 2017). Contudo, a sua exploração comercial está relacionada ao elevado teor de óleo nas sementes, com valores que variam de 27 à 42% (DIAS et al., 2007; FREITAS et al., 2011; EVANGELISTA& SILVA, 2013; EDRISI et al., 2015; FREITAS et al., 2016) e produtividade de 1,9 t/ha de óleo, a partir do terceiro ano de plantio (DIAS et al., 2012). É uma oleaginosa com grande potencial para produção de biocombustíveis, tendo em vista que é uma cultura não-alimentar, não competindo com a produção de alimentos em comparação com o uso de outras culturas como soja, milho e canola.

Especula-se que o centro de diversidade de *J. curcas* seja a América Central, sendo o México o país de domesticação mais provável, por possuir ecótipos tóxicos e não tóxicos, estes últimos encontrados somente naquele país (DIAS et al., 2012; PECINA-QUINTERO et al., 2014; SALVADOR-FIGUEROA et al., 2014). DIAS et al.(2012)postulam o norte mineiro como centro de diversidade secundário da espécie devido à adaptabilidade e ampla variabilidade morfológica encontrada nos acessos daquela região.

A formação e manutenção de Bancos de Germoplasma que sejam representativos da diversidade da espécie é essencial para o desenvolvimento de novas cultivares, pois o sucesso dos programas de melhoramento está diretamente relacionado à existência de ampla variabilidade genética e alta média para o caractere-alvo(FREITAS et al., 2011).

Ao conhecer a diversidade existente no germoplasma é possível delinear estratégias de melhoramento a fim de obter maiores ganhos na produção de híbridos e linhagens (CRUZ et al., 2011; PECINA-QUINTERO et al., 2014). A caracterização molecular do banco de germoplasma é um processo muito importante, pois visa quantificar a variabilidade entre e dentro dos acessos, possibilitando delimitar estratégias de seleção que explorem essa variabilidade de forma mais eficiente nos programas de melhoramento (MONTES et al., 2014). Essa caracterização pode ser realizada por meio de marcadores fenotípicos e/ou moleculares.

Os marcadores fenotípicos são avaliados desde o início da agricultura e se baseiam em características de fácil observação. Alguns estudos têm sido realizados para quantificação da variabilidade genética em *J. curcas* por meio de marcadores fenotípicos (FREITAS et al., 2011; AGUILERA-CAUICH et al., 2015; FREITAS et al., 2016). Porém esses marcadores estão sujeitos a variações a medida que ocorrem alterações no ambiente, geralmente apresentam baixa herdabilidade, em razão da maioria das características serem de natureza quantitativa, e há limitação na quantidade de caracteres avaliados (TOPPA & JADOSKI, 2013).

Em razão disso, o uso de marcadores moleculares é altamente recomendado para caracterização por serem ferramentas de fácil aplicação, de baixo custo relativo e permitirem a exploração de todo o genoma de forma rápida e precisa (CAIXETA et al., 2013). A principal vantagem dos marcadores moleculares, em comparação aos fenotípicos, é a possibilidade de sua aplicação em qualquer estágio fenológico da planta, independentemente da localização da população, do estágio de desenvolvimento vegetativo e das condições bióticas e abióticas (SAKIYAMA et al., 2014). Dentre as diferentes técnicas para obtenção de marcadores moleculares, os microssatélites, também conhecidos como marcadores de Sequências Simples Repetida (SSRs), são recomendados por serem altamente polimórficos, distribuídos ao longo do genoma, multialélicos e de herança codominante.

Estudos de diversidade genética em *J. curcas* por meio de marcadores moleculares SSR têm sido realizados (SUDHEER PAMIDIMARRI et al., 2009; WEN et al., 2010; BRESSAN et al., 2012; PECINA-QUINTERO et al., 2014; SALVADOR-FIGUEROA et al., 2014; ALVES et al., 2015; VÁSQUEZ-MAYORGA et al., 2017). Os resultados com respeito à quantidade de variabilidade genética reportada são contraditórios. Ela tem sido classificada como baixa nos estudos realizados com acessos de regiões que não são consideradas centro de diversidade. Esta baixa variabilidade pode estar relacionada

a diferentes aspectos, dos quais podemos destacar: o tipo de marcador utilizado, se dominante ou codominante; a quantidade de marcadores encontrados e o número limitado de indivíduos avaliados (MAURYA et al., 2015). É preciso considerar também a procedência desses indivíduos, se oriundos de centros de diversidade, bem como o método de coleta e, se for o caso, a instalação do Banco de Germoplasma.

Quando o estudo da variabilidade genética é realizado com acessos não originários do centro de diversidade é de grande importância estudar a forma como a espécie foi introduzida na região ou no país. *J. curcas* foi introduzida no Brasil sendo utilizada, principalmente na construção de cercas vivas (FREITAS et al., 2015).

Estima-se que os colonizadores trouxeram estacas de plantas que apresentavam fenótipo desejado e foram distribuídas nas diferentes regiões do Brasil, ocorrendo a disseminação a partir desses poucos genótipos. Estudos realizados em bancos de germoplasma avaliando a variabilidade genética entre acessos brasileiros têm reportado baixa variabilidade (ALKIMIM et al., 2013; SANTOS et al. 2016). Estes resultados podem estar relacionados ao modo como a planta foi introduzida.

Entretanto, FREITAS et al. (2011) e FREITAS et al. (2016) avaliaram características fenotípicas e de produtividade em acessos pertencentes ao Banco Ativo de Germoplasma de *J. curcas* da Universidade Federal de Viçosa (BAG-UFV) no oitavo e no 52^o mês de plantio, e revelaram a existência de ampla variabilidade a ser explorada. SOUSA (2015) e SOUSA et al. (2017) caracterizaram a diversidade genética entre 93 acessos do BAG-UFV com marcadores moleculares microssatélites confirmando a variabilidade presente nesta coleção e afirmaram que essa variabilidade se deve ao modo de coleta dos acessos e ao modelo utilizado na instalação do banco. Porém, neste trabalho os autores avaliaram apenas um indivíduo por acesso, impossibilitando a avaliação dessa diversidade com a identificação e separação de seus componentes entre e dentro de acessos.

A decomposição da variabilidade genética em seus componentes entre e dentro de acessos (famílias) permite o delineamento de estratégias de melhoramento mais eficientes que possibilitem obter maior ganho genético, em menor tempo. Em razão disto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a variabilidade genética entre e dentro de 28 famílias do BAG-UFV de *Jatropha curcas* L., por meio de marcadores moleculares SSR.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Coleta do material

O BAG-UFV de *J. curcas* está implantado na Fazenda Experimental da Universidade Federal de Viçosa, em Araponga – MG, situada na latitude 20° 39' S, longitude 42° 32' O e altitude de 823 m. É constituído de acessos provenientes de diferentes regiões do Brasil e do mundo (Tabela 1).

A implantação do BAG-UFV foi iniciada em novembro de 2008, com 78 acessos, sendo 75 provenientes de diferentes regiões brasileiras e três acessos oriundos do Camboja. Cada acesso é a representação de uma planta matriz, onde foram retiradas aproximadamente 20 sementes que foram implementadas como uma família no banco. Dessa forma, assumimos que cada acesso do BAG-UFV é, na verdade, uma família de meios irmãos, sendo denominado de família neste trabalho.

Atualmente o BAG-UFV detém um total de 1504 plantas distribuídas em 102 famílias instaladas em cinco experimentos (módulos) delineados em blocos casualizados, com quatro repetições e parcelas de quatro plantas, utilizando o espaçamento 2x2m, com duas testemunhas comuns. Esta estratégia modular possibilitou a implantação de 16 plantas por família, com crescimento contínuo de acordo com a disponibilidade de novas famílias, facilitando a instalação e o manejo. Permite também estudar a estrutura genética da população com maior confiabilidade nas análises e comparáveis entre si. O plantio foi realizado com semeadura direta nas covas e os tratamentos culturais têm sido realizados de acordo com DIAS et al. (2007).

As testemunhas foram constituídas dos genótipos mais plantados no Brasil, adquiridas diretamente do produtor Nagashi Tominaga. Em cada experimento foram implantadas 16 plantas de cada uma das testemunhas. Assim, da mesma forma que os acessos foram considerados famílias, neste trabalho as testemunhas também serão tratadas como famílias.

Para caracterização molecular entre e dentro das famílias do BAG-UFV foram selecionadas 28 famílias consideradas mais divergentes de acordo com os resultados reportados por SOUSA (2015) e SOUSA et al. (2017). Cada família foi constituída de sete plantas, escolhidas aleatoriamente dentre as 16 disponíveis, juntamente com três plantas das famílias testemunhas, compondo um total de 187 plantas.

Foram coletadas amostras de folhas jovens, completamente desenvolvidas, saudáveis e

de coloração verde brilhante. As amostras foram envoltas em papel alumínio devidamente identificado e acondicionadas em caixa de isopor com gelo para o transporte até o Laboratório de Biotecnologia e Melhoramento Vegetal da UFV, onde foram armazenadas em freezer -80°C.

Tabela 1. Identificação e procedência das 28 famílias de *Jatropha curcas* L. do Banco Ativo de Germoplasma da Universidade Federal de Viçosa utilizadas no estudo

Famílias	Local da coleta	Famílias	Local da coleta
UFVJC 4	Santa Vitória - MG	UFVJC 53	Barbacena - MG
UFVJC 5	João Pinheiro - MG	UFVJC 57	Janaúba - MG
UFVJC 6	João Pinheiro - MG	UFVJC 68	São Luís - MA
UFVJC 7	João Pinheiro - MG	UFVJC 70	Ariquemes - RO
UFVJC 10	João Pinheiro - MG	UFVJC 71	João Pinheiro - MG
UFVJC 18	Cana Brava II, Montalvânia	UFVJC 80	Desconhecido
UFVJC 19	Cana Brava II, Montalvânia	UFVJC 83	Araras - SP
UFVJC 22	Ipatinga - MG	UFVJC 84	Petrolina - PE
UFVJC 31	Poté - MG	UFVJC 86	Jequié - BA
UFVJC 33	Itaipé - MG	UFVJC 90	Ipiaú - BA
UFVJC 36	Serra da Ibiapaba - CE	UFVJC 93	Itaitê - BA
UFVJC 41	Jales - SP	UFVJC 98	Iraquara - BA
UFVJC 43	Matozinhos - MG	UFVJC 102	Desconhecido
UFVJC 47	Pirajaí - SP	UFVJC T1	Setor 2 Bento

Após aproximadamente três dias em freezer -80°C, as amostras foram acondicionadas nos frascos do Liofilizador (Modulyo D freeze dryer) com suas respectivas identificações. O Liofilizador mantém as amostras a -41°C e aumenta gradativamente a pressão retirando a umidade das folhas, sem que haja degradação do DNA. O tempo necessário para completa liofilização das amostras neste aparelho foi de 30 horas. Em seguida tais amostras foram maceradas em cadinhos e armazenadas em microtubos de 2mL.

2.2. Extração do DNA

A extração do DNA foi realizada no Laboratório de Biotecnologia do Cafeeiro (BioCafé), no BIOAGRO, UFV. Foi utilizado o protocolo para café proposto por DINIZ et al. (2005), com modificações. Um volume de aproximadamente 50 mg de cada amostra detecido foliar macerado foi adicionado em microtubos de 2 mL, previamente identificados. Dois tampões foram preparados: o primeiro denominado tampão de lise

(Sorbitol 0,35 M, Tris-HCl 0,10 M pH 8,0, EDTA 5 mM) e o segundo de extração (NaCl 2 M, CTAB 2%, Tris-HCl 0,2 M, EDTA 0,05 M). Os dois tampões foram misturados e acrescidos de sarcosil (5%), bissulfito de sódio (1%), carvão ativo (0,1%) e PVP-40 (2%), formando a solução de extração. Após esse preparo, 1,5 mL desta solução, pré-aquecida a 65 °C, foi adicionada em cada microtubo de 2 mL contendo o tecido vegetal macerado de cada amostra. Os tubos foram deixados em banho-maria a 65 °C por 40 min, realizando inversões a cada 10 minutos a fim de promover maior contato entre o tampão e o material vegetal. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 14000 rpm e o sobrenadante transferido para novos tubos, com a adição de 600 µL de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1). Os tubos foram agitados até completa homogeneização e centrifugados por 10 minutos a 14000 rpm. Foram transferidos 800 µL do sobrenadante para outro microtubo e foram adicionados novamente 600 µL de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1), repetindo a agitação e a centrifugação. Foram transferidos 600 µL do sobrenadante para outro microtubo contendo 600 µL de isopropanol gelado, invertendo suavemente para homogeneizar. Os microtubos foram mantidos por 2 horas a -20 °C e então, o material foi centrifugado por 20 minutos a 14000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o pellet lavado com etanol 70% e 95%. O DNA foi ressuscitado em 200 µL de TE (Tris-HCl 10 mM pH 8,0, EDTA 0,1 mM pH 8,0), contendo RNase na concentração final de 80 µg/µL e incubado em banho-maria a 37 °C por 30 minutos. O DNA foi precipitado com 40 µL de NaCl 5M, mais 500 µL de isopropanol 100%, incubado por 2 horas a -20 °C e, em seguida, centrifugado por 20 minutos a 14000 rpm. O sobrenadante foi descartado e, após lavagem com etanol 70% e 95%, foi ressuscitado em 200 µL de água ultrapura autoclavada.

A qualidade do DNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1% corado com Brometo de etídio. A quantificação das amostras foi realizada em espectrofotômetro *NanoDrop2000*, da ThermoScientific. A concentração final foi ajustada para 25ng/µL e o DNA armazenado a -20 °C até o uso.

2.3. Marcadores microssatélites (SSRs)

Foram testados 39 pares de *primers* microssatélites desenvolvidos e validados para *J. curcas* disponibilizados na literatura (Tabela 2). As reações de amplificação por PCR foram realizadas com 50 ng de DNA para um volume total de 20µL contendo 1,5 mM de MgCl₂, 150µM de cada dNTP (dATP, dTTP, dGTP e dCTP), 0,4µM de cada *primer*,

1x de tampão da Taq com KCl [500 mM KCl; 100 mM Tris-HCl (pH 8,8); 0,8% NonidetP40] e 1,2 U de *Taq DNA Polymerase* (Ferramentas Life Science).

As amplificações foram realizadas em termociclador (*MJ Research, PTC 100*), constituídas de desnaturação inicial a 94°C por 2 min, com uma etapa de *touchdown* PCR compreendendo 7 ciclos, iniciando com 94°C por 30 seg, temperatura de anelamento reduzindo 1°C a cada ciclo (de 57 °C até 51 °C) por 30 seg e extensão a 72°C por 40 seg. Na sequência, mais 35 ciclos a 94°C por 30 seg, temperatura de anelamento a 51°C por 30 seg e extensão 72 °C por 30 seg, finalizando com um ciclo de extensão de 72°C por 15 min.

Os produtos da amplificação foram separados em 1 hora de eletroforese vertical em gel de poliacrilamida desnaturante 6x e corados com nitrato de prata, conforme metodologia descrita por BRITO et al. (2010).

2.4. Análise dos dados

Os dados foram codificados como codominantes. Dessa forma, quando o loco apresentou quatro alelos foram atribuídos os códigos 11, 22, 33 e 44 para as formas homozigotas e 12, 13, 14, 23, 24 e 34 para as formas heterozigotas. Para as análises foram utilizados apenas os dados gerados pelos locos polimórficos.

2.4.1. Diversidade entre e dentro de famílias

Para caracterização da diversidade genética entre famílias foram estimadas as frequências gênicas e alélicas, os números de alelos observados (*na*) e efetivos (*ne*) (KIMURA & CROW, 1964), a heterozigosidade observada (*Ho*) e esperada (*He*), também descritas como diversidade gênica de Nei (NEI, 1973), o coeficiente de endogamia ou Índice de fixação de Wright (WRIGHT, 1978), o Índice de diversidade de Shannon-Wiener (*H'*) (LEWONTIN, 1995) e a matriz de distâncias de Nei (NEI, 1972), utilizando-se o *software* Popgene (YEH & BOYLE, 1997).

Com o *software* Genes (CRUZ, 2013) foi obtido o Conteúdo médio de Informação Polimórfica (PIC), calculado segundo BOTSTEIN et al. (1980), a partir do seguinte modelo:

$$PIC = 1 - \sum_{j=i}^a p_i^2 - \sum_{i,j=1}^a \sum_{(i \neq j)}^a p_i^2 p_j^2$$

onde p_i é a frequência do *i*-ésimo alelo do *j*-ésimo loco estudado.

Tabela 2. Identificação e sequência dos *primers* microssatélites utilizados na avaliação da variabilidade genética entre e dentro de famílias do BAG-UFV de germoplasma de *Jatropha curcas*L. da Universidade Federal de Viçosa

<i>Primer</i>	<i>Sequências 5'-3'</i>	
	<i>Forward</i>	<i>Reverse</i>
³ CESR0163	AACCACAGGAGTTGGTAATG	GAAAGAAGCAACAGAAATGG
³ CESR0333	ACAATATACAATGGCGATTTC	TAATGAATCTGTAGGACCCG
³ CESR0399	CAATGCATGGATCATAAGTG	CTCAAGTCAAATCTGGGAAC
³ CESR0836	CTTCCGCCTTCTCTTCCC	CATGGTTATCAGCCCATAGT
³ CESR0756	CAGGTTCGTCTTCTTCAACT	ATATATGATCCCGACAACAA
¹ JCENA87	ATCTGGAGTGAAACCAAAGA	CACATGGTAAGCATTACAAGC
¹ JCENA27	CATTTTTCATCAAGGCCTAC	GTATTTCTCCACACGCAACT
¹ JCENA41	CTTTCTTACCCCTCATCCTT	AAAGCCAGGACATACTTGAA
¹ JCENA47	GCCCGAGTTCTCTATAAGGT	CCATGGACTATCTCAACTTC
¹ JCENA63	GCGTGGACTATCTCAACTTC	CTGATTACGCAATGGAACTA
² JCDS10	CATCAAATGCTAATGAAAGTACA	CACACCTAGCAAACACTTGTGA
² JCMS21	TAACCTCTTCCTGACA	ATAGGAAATAAGAGTTCAAA
² JCPS1	GAGGATATTACAGCATGAATGTG	AATCAATCAATCTTTGGCAAA
³ SSRY63	TCAGAATCATCTACCTTGGCA	AAGACAATCATTTTGTGCTCCA
³ SSRY132	CTTTTGGCAGTCTTCCTGC	TGTCCAATGTCTTCCTTTCTT
³ SSRY184	TCATCCCAAAAATACCTCTAACA	CTCCGACAAGCATGTGAATG
³ SSR107	CCATTTTCTCTTGCTTCTGTCA	TGGTTTGAATAATAAAATCCTT
³ SSRY150	CAATGCAGGTGAAGTGAATACC	AGGGTGCTCTTCAGAGAAAGG
³ SSRY153	TTCCAGAAAGACTTCCGTTCA	CTCAACTACTGCACTGCACTC
³ SSRY133	AGCATGTCATTGCACCAAAC	CGACTGCATCAGAACAATGC
³ SSRY50	CCGCTTAACTCCTTGCTGTC	CAAGTGGATGAGCTACGCAA
³ SSRY7	TGCCTAAGGAAAATTCATTCAT	TGCTAAGCTGGTCATGCACT
³ SSRY146	TTCCCTCGCTAGAACTTGTC	CTATTTGACCGTCTTCGCCG
³ SSRY113	TTTGCTGACCTGCCACAATA	TCAACAATTGGACTAAGCAGC
³ SSRY46	TCAGGAACAATACTCCATCGAA	CGCTAAAGAAGCTGTGAGC
³ SSRY53	CCATGCAGTAGTGCCATCTTT	ATTTTCACCAACCGCAACTC
³ SSRY136	CGACTGCATCAGAACAATGC	AGCATGTCATTGCACCAAAC
³ SSRY100	ATCCTTGCCCTGACATTTTGC	TTCGCAGAGTCCAATTGTTG
³ SSRY127	CTTCGCCCTCTACAAAAGGA	GCTGAACTGCTTTGCCAACT
³ SSRY61	GGCTGCTTTACCTTCTACTCAGA	CAAGAACGCCAATATGCTGA
³ SSRY4	ATAGAGCAGAAGTGCAGGCG	CTAACGCACACGACTACGGA
³ SSRY185	GAAGAAGACGGTTAAAGCAAGTT	ATGCCAGTTTGCTATCCAGG
³ SSRY177	ACCACAAACATAGGCACGAG	CACCCAATTACCAATTACCA
³ SSRY151	AGTGGAATAAGCCATGTGATG	CCCATAATTGATGCCAGGTT
³ SSRY146	TTCCCTCGCTAGAACTTGTC	CTATTTGACCGTCTTCGCCG
³ SSRY159	CTTATCCTGTCCCCTCCACC	GACAATTGCATAGGAAGCACA
³ SSRY119	AACATAGGCATTAAAGTTTGGA	GCAAATGTGTTTTCAATATAAGGC
³ SSRY58	GAAGGACAAGCAAAGAAGCAA	TGGAATCCAATATTGATGACTAAGA
² JCDS24	GGATATGAAGTTTCATGGGACAAG	TTCATTGAATGGATGGTTGTAAGG

Fontes:¹BRESSAN et al. (2012);²SUDHEER PAMIDIMARRI et al. (2009); ³WEN et al. (2010).

Em seguida, um dendrograma circular foi construído a partir da matriz de distâncias genéticas de Nei, empregando-se o método de agrupamento da ligação média entre grupos (UPGMA) com o *software* Mega(KUMAR et al., 2016).

Com os dados codificados, foi realizado também um estudo da estrutura da população, com o *software* Structure(PRITCHARD et al., 2000), baseado em estatística bayesiana. Foram testados valores de K que variaram de 1 a 20, com 20 repetições. Cada corrida foi implementada com 500.000 interações iniciais e 1.000.000 de simulações de Monte Carlo, via Cadeias de Markov (MCMC). Para definição do melhor número de grupos genéticos foi realizado o cálculo de ΔK , conforme descrito por EVANNO et al. (2005), utilizando-se o *software* StructureHarvester(EARL& VONHOLDT, 2012).

2.4.2. Diversidade entre famílias

A análise de variância molecular (AMOVA) foi utilizada para revelar a divisão da variância em seus componentes entre e dentro das famílias. A AMOVA foi processada utilizando os dados codificados de acordo com a metodologia descrita por EXCOFFIER et al. (1992), usando-se o *software* Genes (CRUZ, 2013) e no seguinte modelo:

FV	gl	SQ	QM	E(QM)	Φ_{ST}
Entre famílias	$a - 1$	SQE	QME	$\sigma_i^2 + \hat{N}\sigma_p^2$	$\frac{\sigma_p^2}{\sigma_T^2}$
Dentro famílias	$N - a$	SQD	QMD	σ_i^2	
Total	$N - 1$	SQT	—	σ_T^2	

Em que a : número de famílias; N : número total de plantas; $\hat{N}$: média harmônica do número de plantas por famílias, sendo $\hat{N} = \frac{N - \sum_i \frac{N_i^2}{N}}{a - 1}$; σ_T^2 : variância total; σ_i^2 : variância dentro das famílias; e σ_p^2 : variância entre as famílias.

3. RESULTADOS

Dos 39 pares de *primers* testados, nove apresentaram amplificação dos

fragmentos com bandas nítidas e individualizadas. Destes nove, seis foram eficientes em identificar polimorfismo nas 189 plantas do BAG-UFV de *Jatropha curcas* L., e foram utilizados nas análises de estrutura da população e diversidade. As frequências alélicas observadas (Tabela 3) apresentaram uma variação de 0,0080 (marcador SSRY146) a 0,9572 (SSRY113). O alelo A_1 foi o mais frequente de cada marcador e variou de 0,5027 (SSRY159) a 0,9572 (SSRY113). Os locos SSRY159 e SSRY146 foram os que apresentaram a maior detecção de polimorfismo, de acordo com a frequência de alelos, pois revelaram maior número de alelos (4), com ampla variação da frequência.

Tabela 3. Frequência dos alelos A_1 , A_2 , A_3 e A_4 dos seis locos polimórficos obtidos com marcadores microssatélites e utilizados na avaliação de variabilidade genética entre e dentro das 28 famílias de *Jatropha curcas* L.

Locos	A_1	A_2	A_3	A_4
JCENA87	0,5535	0,4465	-	-
SSRY113	0,9572	0,0428	-	-
SSRY159	0,5027	0,0187	0,2059	0,2727
SSRY146	0,6070	0,0080	0,0187	0,3663
SSRY100	0,5856	0,0294	0,3850	-
SSRY151	0,6818	0,2968	0,0214	-

Os seis locos polimórficos analisados permitiram a identificação de 18 alelos (na), que variaram de 2 a 4, com média de 3 alelos/locos. O número de alelos efetivos (ne) variou de 2,70 a 1,09, com média de 1,93 e desvio padrão de 0,52 (Tabela 4). As estimativas da heterozigosidade observada (H_o) e esperada (H_e) são importantes para quantificar a diversidade genética dentro das populações. Com estas estimativas é possível identificar se a população está sob acasalamento ao acaso ou não. H_o variou de 0,04 a 0,83, com um valor médio de 0,48 e desvio padrão de 0,26, enquanto H_e variou de 0,08 a 0,63, com média de 0,44 e desvio padrão de 0,19 (Tabela 4). Essas estimativas confirmam a ampla natureza heterozigótica do BAG-UFV. H_o apresentou valores menores do que a H_e para os marcadores SSRY113, SSRY159 e SSRY100, em linha com valores positivos do coeficiente de endogamia ($f=0,48$, $0,36$ e $0,11$, respectivamente). Os demais marcadores apresentaram estimativas negativas para os coeficientes de endogamia, variando de $-0,22$ a $-0,68$, e média de $-0,03$. As estimativas do coeficiente de endogamia identificam a ocorrência de cruzamentos preferenciais

entre aparentados na população. Valores negativos para esse coeficiente são interpretados como endogamia nula, ou seja, não há cruzamentos preferenciais na população. Esses resultados indicam que as famílias do BAG-UFV são provenientes de populações sob acasalamento ao acaso.

Outro estimador importante na caracterização da diversidade é o conteúdo médio de informação polimórfica (PIC) que mede o poder discriminatório do marcador, considerando não apenas o número de alelos por locos, mas também a frequência do alelo. Assim, foram observadas estimativas para o PIC variando de 0,08 (SSRY113) a 0,57 (SSRY159). O marcador SSRY113 apresentou o menor PIC.

Os valores estimados para o índice de Shannon-Wiener (H') apresentaram variação de 0,18 (SSRY113) a 1,10 (SSRY159), com valor médio de 0,71 (Tabela 4). Esse valor indica elevada variabilidade nas famílias de *J. curcas* analisadas.

Tabela 4. Estimativas genéticas populacionais para as 28 famílias de *Jatropha curcas* L. do BAG-UFV, geradas por seis marcadores moleculares microsatélites

Locos	na	ne	Ho	He	<i>f</i>	H'	PIC
JCENA87	2	1,98	0,83	0,49	-0,68	0,69	0,37
SSRY113	2	1,09	0,04	0,08	0,48	0,18	0,08
SSRY159	4	2,70	0,40	0,63	0,36	1,10	0,57
SSRY146	4	1,99	0,60	0,50	-0,22	0,78	0,40
SSRY100	3	2,03	0,45	0,51	0,11	0,78	0,41
SSRY151	3	1,81	0,55	0,45	-0,23	0,70	0,36
Média	3	1,93	0,48	0,44	-0,03	0,71	0,36
Desvio padrão	0,89	0,52	0,26	0,19	0,43	0,30	0,16

na: número total de alelos por loco; ne: número efetivo de alelos; Ho: heterozigosidade observada; He: heterozigosidade esperada; *f*: Coeficiente de endogamia; H' : índice de diversidade de Shannon-Wiener e PIC: conteúdo de informação de polimorfismo.

Para análise da diversidade entre os 187 acessos foi obtido um dendrograma UPGMA, utilizando a matriz de distâncias de Nei (NEI, 1972)(Figura 1). Observou-se a formação de 11 grupos separados da seguinte forma: Grupo I (vermelho, 45 plantas), Grupo II (verde, 17 plantas), Grupo III (azul escuro, 2 plantas), Grupo IV (roxo, 3 plantas), Grupo V (marrom, 12 plantas), Grupo VI (cinza, 14 plantas), Grupo VII (verde claro, 5 plantas), Grupo VIII (amarelo, 45 plantas), Grupo IX (azul, 27 plantas), Grupos X (azul claro, 10 plantas) e XI (laranja, 7 plantas).

Nesta análise foram consideradas as distâncias entre acessos, sem vinculação da

família. Dessa forma é possível observar a existência de ampla variabilidade entre eles, visto que indivíduos pertencentes à mesma família não se agruparam, mas se distribuíram em diferentes grupos.

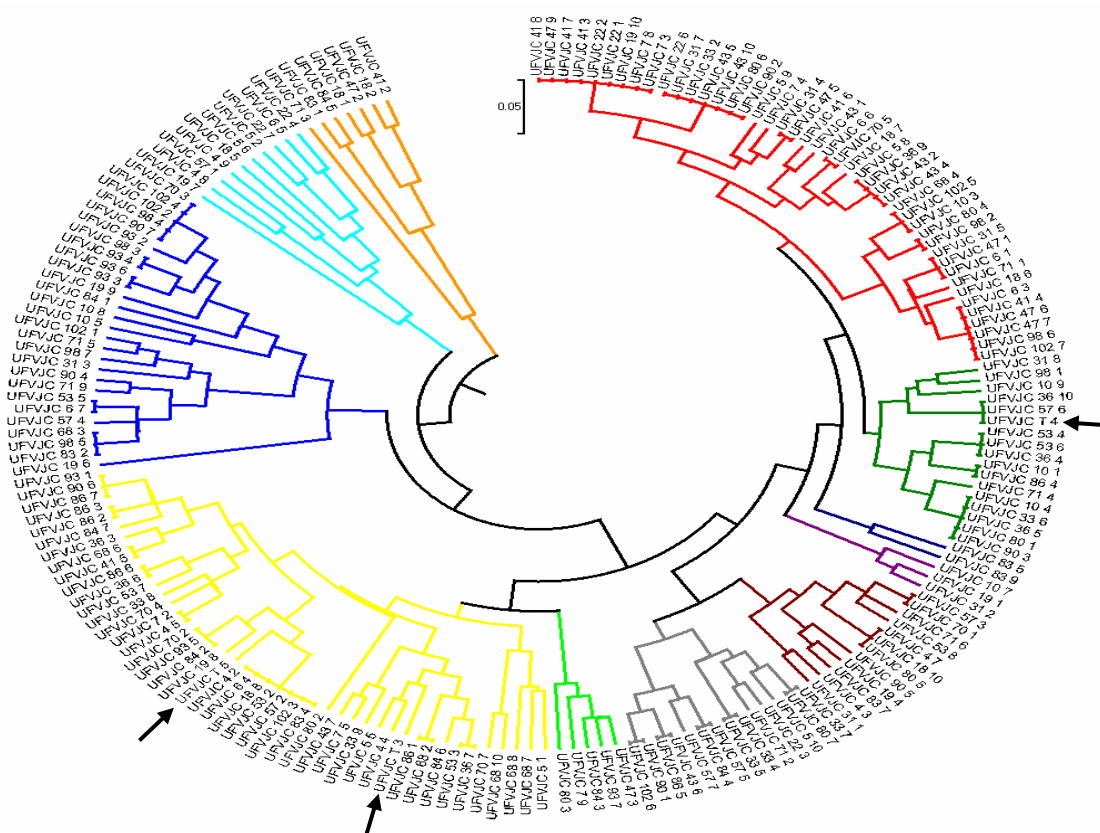


Figura 1. Dendrograma de UPGMA baseado na matriz de distâncias de Nei (NEI, 1972) para avaliação da diversidade entre 187 plantas de *Jatropha curcas* L. do BAG-UFV, por meio de marcadores moleculares microssatélites.

As famílias UFVJC 43 e UFVJC 41 foram as que apresentaram maior número de acessos (5 acessos cada uma) no mesmo grupo (grupo I). Isto indica que essas famílias apresentam menor variabilidade entre seus indivíduos, quando comparadas as demais. Em contrapartida, os indivíduos da família UFVJC 19 foram os que apresentaram maior variabilidade com distribuição em seis grupos diferentes (I, IV, V, VIII, IX e X). Os acessos UFVJC 10_7, UFVJC 19_1 e UFVJC 31_2 formaram um grupo distinto (grupo IV), o que indica maior similaridade entre esses acessos, apesar de serem provenientes de famílias diferentes. Convém observar que a inserção de subscrito, seguido do número, a exemplo de UFVJC 10_7 denota o acesso 7 da família UFVJC 10. As testemunhas, que representam os genótipos plantados comercialmente, foram separadas

em grupos diferentes (indicado por setas), sendo UFVJCT1_3 e UFVJCT1_5 o grupo amarelo e UFVJCT1_4 no grupo verde.

A análise com o *software* Structure permite verificar a estrutura da população. Visualiza-se a ancestralidade dos indivíduos constituintes das famílias por meio da sua identificação e organização em grupos. Dessa forma, de acordo com o cálculo do ΔK , quatro grupos distintos ($k=4$) foi o número ótimo para classificar todas as famílias e estudar a estrutura da população (Figura 2).

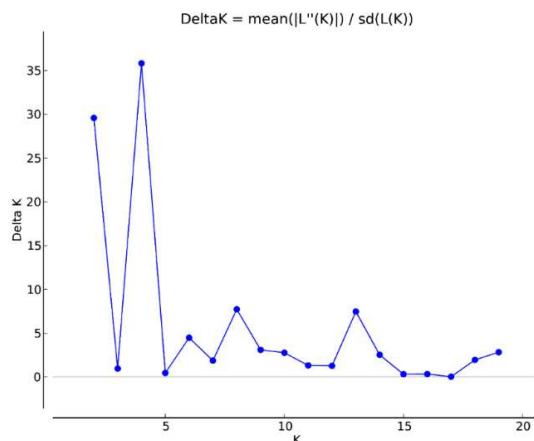


Figura 2. Valores estimados de Δk para caracterização do melhor número de grupos, segundo a metodologia proposta por EVANNO et al. (2005).

Na Figura 3 visualiza-se a proporção de alelos proveniente de cada grupo genético (quatro cores) e para cada indivíduo (barra vertical). Analisando a estrutura da população nos quatro grupos observa-se que alguns indivíduos apresentam maior variação no fracionamento dos alelos, indicando a presença de *admixture* na ancestralidade das populações. Indivíduos de diferentes famílias apresentaram distribuição aleatória nos quatro grupos, e alguns acessos apresentaram proporções semelhantes de alelos, como UFVJC47_5 e UFVJC31_4.

Os grupos foram formados por famílias provenientes de diferentes estados do Brasil, de forma que não houve distinção entre as regiões de coleta e a formação dos grupos. Poucas famílias tiveram seus acessos reunidos em apenas um grupo, dentre elas é possível destacar UFVJC86 (grupo azul) proveniente de Jequié-BA, UFVJC4 (grupo amarelo) de Santa Vitória-MG e UFVJC41 e 47 (grupo vermelho) ambos de São Paulo (Jales e Pirajá respectivamente).

Os acessos das famílias testemunha foram separados nos grupos amarelo (UFVJCT1_3 e UFVJC T1_5) e vermelho (UFVJCT1_4). Avaliando a proporção dos

alelos é possível identificar correspondência com a análise do dendrograma, visto que cada um dos três indivíduos apresentou proporções diferentes.

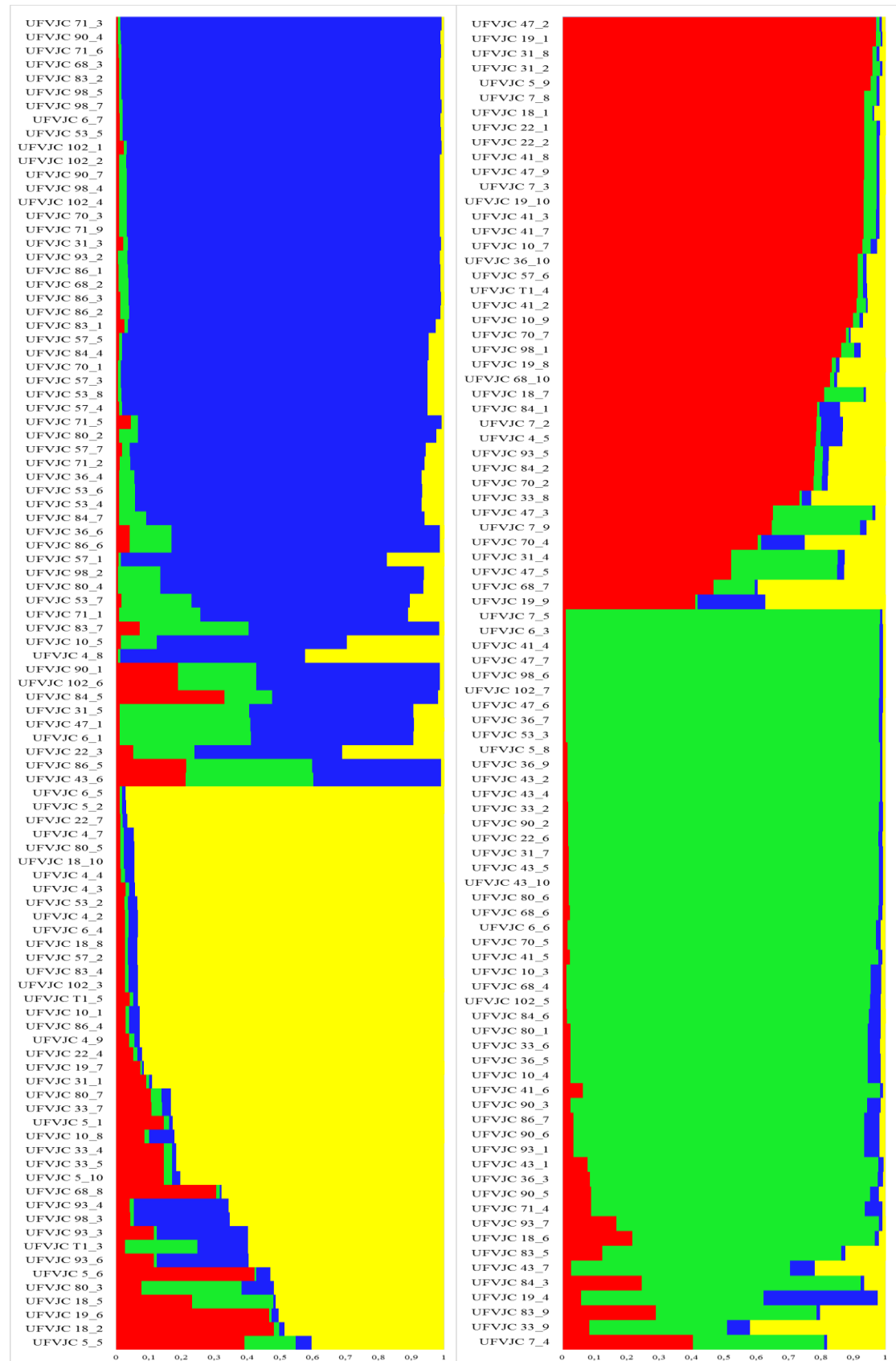


Figura 3. Gráfico da estrutura da população, com a separação em quatro grupos, dos

187 acessos do BAG-UFV de *Jatropha curcas*L.

A análise de variância molecular (AMOVA) permite a divisão da variância total em seus componentes entre e dentro das famílias. Com os seis marcadores microsatélites utilizados foi possível identificar que 92,4% da variabilidade genética está contida dentro das famílias (Tabela 5). Apenas 7,59% da variação total ocorre entre as famílias.

Tabela 5. Análise de variância molecular (AMOVA) de 28 famílias de *Jatropha curcas* L. do BAG-UFV

FV	gl	SQ	QM	Componentes de variância	% de variação	Φ_{ST}
Entre famílias	27	15,79	0,58	0,03	7,59	0,07
Dentro famílias	159	60,05	0,37	0,37	92,40	
Total	187	75,84	0,40	0,40		

O estimador Φ_{ST} representa a diferenciação entre famílias e o valor encontrado ($\Phi_{ST}=0,07$) indica elevada diferenciação entre elas.

4. DISCUSSÃO

A existência de diversidade genética é importante em programas de melhoramento para seleção de genitores, visando obter a melhor combinação de alelos favoráveis. O conhecimento da distribuição da variabilidade entre e dentro das populações permite traçar estratégias eficientes para coleta de germoplasma e para a seleção. Poucos estudos de diversidade entre e dentro de acessos de *Jatropha curcas* L. têm sido desenvolvidos com marcadores moleculares microsatélites (SSRs) (MAURYA et al., 2015; MONTES OSORIO et al., 2014; SALVADOR-FIGUEROA et al., 2014). Este é o primeiro estudo objetivando avaliar a diversidade genética entre e dentro de 28 famílias, totalizando 187 acessos, nesta coleção.

As estatísticas de diversidade estimadas no presente estudo corroboram com aquelas reportadas em pesquisas recentes. O número médio de alelos por loco (n_a) foi de 3, similar ao reportado por SANTOS et al. (2016), os quais avaliaram 43 genótipos com 11 marcadores SSR e identificaram de 2 a 5 alelos. DEL ANGEL et al. (2016),

utilizando seis marcadores SSRs, também identificaram de 2 a 5 alelos, com média de 3 alelos/loco. BRESSAN et al. (2012), ao desenvolverem e validarem 41 marcadores SSRs, identificaram maior variação alélica (2 a 8 alelos). BRESSAN et al. (2013) utilizaram cinco marcadores SSRs para testar o sistema reprodutivo de *J. curcas* e reportaram variação de 2 a 6 alelos, com média de 4,67 alelos/loco. Em contrapartida, SALVADOR-FIGUEROA et al. (2014), ao avaliarem 93 acessos de *J. curcas* provenientes do México, com 10 pares de marcadores SSRs, identificaram 2,28 alelos/loco. ONE et al. (2014), ao estudarem a estrutura de uma população F_2 com marcadores SSRs, identificaram valores mais baixos (média de 2,13 alelos/loco) do que os encontrados no presente trabalho.

O número de alelos efetivos (n_e) quantifica os alelos que apresentaram frequência significativa na população. Os valores de n_e encontrados (1,09 a 2,70) foram maiores do que os reportados por WEN et al. (2010) e SALVADOR-FIGUEROA et al. (2014), porém similares aos de ONE et al. (2014). WEN et al. (2010) obtiveram n_e cujos valores variaram de 1,45 a 1,67 em seu estudo com 45 acessos de *J. curcas* avaliados com marcadores SSRs. SALVADOR-FIGUEROA et al. (2014) encontraram valores de n_e de 1,50 a 1,82. ONE et al. (2014), ao avaliarem uma população F_2 com marcadores SSRs, relataram n_e de 1,35 a 2,71.

O conteúdo de informação polimórfica (PIC) indica o poder discriminatório do marcador. Os valores de PIC variaram de 0,08 a 0,57, com média de 0,36 sendo, por isso, considerados moderadamente informativos (BOTSTEIN et al., 1980). VÁSQUEZ-MAYORGA et al. (2017) encontraram valores semelhantes (0,04 a 0,67), ao avaliarem 50 acessos da Costa Rica, porém com média menor (0,27). Por outro lado, MONTES et al. (2014), ao estudarem a diversidade em 70 acessos provenientes da África, Ásia e América do Sul, encontraram valores mais baixos de PIC (0,01 a 0,50, e média de 0,15). MONTES et al. (2014) associaram esses valores à elevada homozigose nos acessos avaliados, e sugeriram ocorrência de altas taxas de autofecundação neles. No entanto, os valores encontrados nas estimativas de heterozigosidade (de 0,04 a 0,83) observada naquele trabalho não confirmam a especulação.

As estimativas de heterozigosidade observada (H_o) e esperada (H_e) permitem avaliar não somente a diversidade genética, mas também inferir sobre a estrutura das populações. Os valores médios obtidos neste trabalho ($H_o=0,48$ e $H_e=0,44$) foram de mesma magnitude que os encontrados por ONE et al. (2014) ($H_o=0,47$ e $H_e=0,43$) e por SANTOS et al. (2016) ($H_o=0,64$ e $H_e=0,40$), quando avaliaram 48 acessos da coleção

de germoplasma da EPAMIG por meio de marcadores SSR e ISSR.

As estimativas do coeficiente de endogamia (f), também chamado índice de fixação, são utilizadas para identificar a ocorrência de cruzamentos preferenciais entre aparentados na população que, por consequência, alteram a frequência de heterozigotos. Valores negativos para esta estimativa são interpretados como endogamia nula, de forma que na população não há ocorrência de acasalamentos entre aparentados (CRUZ et al., 2011). O f positivo em 3 dos 6 marcadores avaliados pode ter relação com a ocorrência de autofecundação entre algumas plantas do BAG-UFV. ALVES et al. (2015) identificaram variações na taxa de cruzamento ($t_m=0,88$) e ocorrência de autofecundação ($s=0,12$) em populações de *J. curcas*. Taxas de cruzamento misto também foram encontradas por BRESSAN et al. (2013) ($t_m=0,68$ e $s=0,32$). Esse processo dinâmico na reprodução da espécie pode gerar plantas com diferentes níveis de endogamia, tal como identificado neste estudo. Porém, com base no valor médio de f ($-0,03$) pode-se afirmar que o nível de endogamia encontrado não foi significativo. Valor similar para f ($f=-0,10$) foi reportado por VÁSQUEZ-MAYORGA et al. (2017).

O índice de Shannon-Wiener (H') é muito utilizado como medida de diversidade dentro de populações. Ele considera em seu cálculo a frequência do genótipo e o número de classes genotípicas para um dado loco como uma probabilidade. Por isso, é considerado um índice de riqueza genotípica. Os valores encontrados de H' variaram de 0,18 a 1,10 (média 0,71), o que revelou a existência de elevada variabilidade genética dentro das 28 famílias de *J. curcas* do BAG-UFV. PIOTO et al. (2015), ao estudarem a diversidade genética entre e dentro de cinco populações de *J. curcas* coletadas no estado de São Paulo, por meio de marcadores AFLP, encontraram valores médios de 0,43 para H' , inferiores aos encontrados no presente trabalho. WEN et al. (2010) reportaram valores de H' de 0,41 a 0,50, mais baixos que os descritos no presente trabalho, esses autores consideraram os acessos estudados com elevada variabilidade. Não obstante, ONE et al. (2014) obtiveram valores para H' variando de 0,13 a 1,04, em linha com o presente trabalho.

A formação de 11 grupos por UPGMA a partir da matriz de distâncias de Nei evidencia a presença de ampla variabilidade entre os acessos do BAG-UFV, como relatado anteriormente por FREITAS et al. (2011), SOUSA (2015) e FREITAS et al. (2016). A maioria desses acessos são provenientes da região Norte do estado de Minas Gerais, corroborando com a ideia de essa região ser um centro secundário de

diversidade da espécie, como proposto por DIAS et al.(2012).

A análise da estrutura da população realizada no *software*Structure revelou a distribuição das famílias em quatro grupos ($k=4$) e evidenciou a existência de *admixture* na ancestralidade de alguns indivíduos. Porém esse fato não apresentou relação com a região de coleta nem com a ordem das famílias. Resultados semelhantes ($k=4$) foram reportados por MAURYA et al. (2015) ao avaliarem 96 acessos de *J. curcas* de diferentes regiões do mundo, incluindo acessos tóxicos e não tóxicos. Naquele caso, os autores atribuíram essa *admixture* a afinidade filogenética dos acessos. OVANDO-MEDINA et al. (2011), estudando cinco populações de *J. curcas* do México, evidenciaram a formação de cinco grupos ($k=5$) que estavam relacionados a origem geográfica das populações, porém também foi identificada ocorrência de *admixture* na ancestralidade dos acessos. Para explicar essa mistura, os autores levantaram hipóteses como a biogeografia da espécie, ou seja a distribuição no espaço pelo tempo, que levou a ocorrência de cruzamentos entre indivíduos de diferentes origens, fato este que sustentaria a ideia da origem heterozigótica da população. Ambos os trabalhos supracitados continham acessos do centro de diversidade, o que contribuiu para formação do elevado número de grupos. Dessa forma, o presente trabalho é o pioneiro a retratar a formação de quatro grupos e elevada variabilidade genética utilizando apenas acessos fora do centro de diversidade da espécie.

SANTOS et al. (2016), utilizando marcadores SSRs e ISSRs, detectaram a formação de três grupos gênicos ($k=3$) ao avaliar a diversidade genética de 48 acessos do BAG da EPAMIG, acessos estes também provenientes de Minas Gerais. Porém foi relatada baixa variabilidade genética entre os acessos. ALKIMIM et al. (2013), ao avaliarem a diversidade genética entre 46 acessos do mesmo BAG, com marcadores RAPD e ISSRs, também encontraram baixa variabilidade genética entre os acessos. Estes resultados contrastantes podem ser atribuídos ao poder discriminatório do marcador utilizado, no caso ISSR e RAPD, que por serem marcadores dominantes não permitem a identificação do genótipo heterozigoto, e assim se tornam menos informativos que os marcadores microsatélites. Por outro lado, este contraste evidencia a eficácia da estratégia de implantação do BAG-UFV, onde foram implantadas 16 plantas por família. Essa estratégia possibilitou reunir maior variabilidade genética na coleção tornando-a mais representativa da diversidade existente na espécie.

A Análise de Variância Molecular (AMOVA) revelou que a maior proporção da variação encontrada está contida dentro das famílias (92,4%), com um índice de

diferenciação (Φ_{ST}) de 0,07 entre famílias. OVANDO-MEDINA et al. (2011) reportaram 87,8% da variação ocorrendo dentro das populações, com Φ_{ST} de 0,04, ao avaliarem cinco populações no México, indicando elevada variabilidade e significativa diferenciação entre as populações. MAURYA et al. (2015) detectaram 94,0% da variação total dentro das populações ao estudar 96 acessos, por meio de marcadores SSR, com índice de diferenciação de 0,06, considerado elevado, apesar de reportar baixa variabilidade nos acessos estudados. MAVUSO et al. (2016) quantificaram a variação dentro das populações como sendo de 68,7% da variação total ao utilizar marcadores ISSR para avaliar 13 populações de *J. curcas*. Por outro lado, GRATIVOL et al. (2011) quantificaram a diversidade genética de 332 acessos de *J. curcas* provenientes de oito estados do Brasil, utilizando marcadores ISSRs e reportaram baixa variabilidade, além de identificarem que a maior parte da variabilidade genética existente ocorre entre os acessos (37,4%) e entre regiões (33,4%). Os autores atribuíram essa baixa divergência genética como reflexo de seleções realizadas por produtores a fim de obter maiores produtividades. Estes trabalhos corroboram com os resultados apresentados, evidenciando a expressiva diferenciação existente nas famílias pertencentes ao BAG-UFV e a elevada variabilidade genética tendo a variação dentro das famílias como seu componente mais importante.

FREITAS et al. (2011) realizaram o primeiro estudo de diversidade genética no BAG-UFV de *J. curcas* utilizando características fenotípicas e de produtividade. Naquele trabalho a coleção se encontrava no fim do período juvenil mas, ainda assim, foi revelada elevada variabilidade com a formação de oito grupos. Outro estudo realizado por FREITAS et al. (2016) fundamentou a presença de elevada variabilidade genética na coleção após 52 meses de plantio, com a formação de cinco grupos, também por meio de características fenotípicas e de produtividade. Além disso, os autores reportaram o elevado teor de óleo dos acessos da coleção, que variou de 30 a 39,6% com média de 36,2% e a correlação desta característica com outros parâmetros de produtividade. SOUSA (2015) realizou estudo para avaliar a diversidade genética do mesmo BAG, por meio de marcadores microssatélites, e confirmou a presença de ampla variabilidade entre acessos com a formação de nove grupos. No presente trabalho, a elevada variabilidade entre as famílias descrita anteriormente foi comprovada com a formação de 11 grupos. Além disso, foi possível revelar que esta ampla diversidade genética ocorre dentro das famílias, de forma que 92,4% da variabilidade presente se encontra dentro das famílias. Este resultado confirma o acerto da estratégia utilizada na

formação da presente coleção, onde foi preconizado a coleta de maior número de sementes por acesso, ao invés de maior número de acessos. A não adoção dessa estratégia de coleta na formação de outras coleções pode ser considerada a razão de os estudos de diversidade reportarem baixa variabilidade genética na espécie.

Baseado nos resultados apresentados neste trabalho sugerimos que a etapa seleção dos genótipos em programas de melhoramento seja realizada em experimentos com grande números de repetições e em condições variadas de ambientes, corroborando com SANTOS et al. (2016). Devido a elevada variabilidade genética dentro de famílias, a seleção deve ser praticada entre plantas dentro das famílias, coletando mais plantas por família, pois assim se estará capturando a variabilidade de forma eficiente.

5. CONCLUSÕES

Os seis marcadores moleculares microssatélites utilizados (JCENA87, SSRY113, SSRY159, SSRY146, SSRY100 e SSRY151) foram eficientes em quantificar a diversidade genética entre e dentro das 28 famílias do BAG-UFV de *Jatropha curcas*L.

Constatou-se que a variância dentro das famílias é responsável por 92,4% da variabilidade total dos acessos. Em razão disso, recomenda-se maior atenção na etapa da seleção nos programas de melhoramento, dando ênfase em selecionar mais plantas por famílias.

Estes resultados são os primeiros a revelar os componentes da variância entre e dentro de acessos de *Jatropha curcas* L. provenientes de diferentes regiões do Brasil.

REFERÊNCIAS

- AGUILERA-CAUICH, E. A.; PÉREZ-BRITO, D.; YABUR, A. N.; LÓPEZ-PUC, G.; NAJERA, G. C.; RIVERO, J. C. S.; ATOCHE, C. R.; UC-VÁRGUEZ, A.; GÓNGORA-CANUL, C.; MIJANGOS-CORTES, J. O. Assessment of phenotypic diversity and agronomic contrast in American accessions of *Jatropha curcas* L. **Industrial Crops and Products**, v. 77, p. 1001-1003, 2015.
- ALKIMIM, E. R.; SOUSA, T. V.; SOARES, B. O.; SOUZA, D. A.; JUHÁSZ, A. C. P.; NIETSCHE, S.; COSTA, M. R. Genetic diversity and molecular characterization of physic nut genotypes from the active germplasm bank of the Agricultural Research Company of Minas Gerais, Brazil. **African Journal of Biotechnology**, v. 12, n. 9, p. 907–913, 2013.
- ALVES, P. F.; SEBBENN, A. M.; MANOEL, R. O.; CAMBUIM, J.; MORAES, M. A. de; JUNIOR, E. F.; KUBOTA, T. Y. K.; PUPIN, S.; MORAES, M. L. T. de. Sistema de reprodução em uma população base de *Jatropha curcas* L. **Scientia Forestalis**, v. 43, n. 106, p. 427–434, 2015.
- BOTSTEIN, D.; WHITE, R. L.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R. W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **American Journal of Human Genetics**, v. 32, n. 3, p. 314–331, maio 1980.
- BRESSAN, E. de A.; SCOTTON, D. C.; FERREIRA, R. R.; JORGE, E. C.; SEBBENN, A. M.; GERALD, L. T. S.; FIGUEIRA, A. Development of microsatellite primers for *Jatropha curcas* (Euphorbiaceae) and transferability to congeners. **American Journal of Botany**, v. 99, n. 6, p. e237–e239, 1 jun. 2012.
- BRESSAN, E. A.; SEBBENN, A. M.; FERREIRA, R. R.; LEE, T. S. G.; FIGUEIRA, A. *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae) exhibits a mixed mating system, high

- correlated mating and apomixis. **Tree Genetics and Genomes**, v. 9, n. 4, p. 1089-1097. 2013.
- BRITO, G. G.; CAIXETA, E. T.; GALLINA, A. P.; MACIEL-ZAMBOLIM, E.; ZAMBOLIM, L.; DIOLA, V.; LOUREIRO, M. E. Inheritance of coffee leaf rust resistance and identification of AFLP markers linked to the resistance gene. **Euphytica**, v. 173, p. 255-264, 2010.
- 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.
- CEASAR, S. A.; IGNACIMUTHU, S. Applications of biotechnology and biochemical engineering for the improvement of *Jatropha* and Biodiesel: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 15, n. 9, p. 5176–5185, 2011.
- CRUZ, C. D.; FERREIRA, F. M.; PESSONI, L. A. **Biometria aplicada ao estudo da Diversidade Genética**. 1^a ed. Visconde do Rio Branco - MG: Suprema, 2011.
- CRUZ, C. D. GENES - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 35, n. 3, p. 271–276, 2013.
- DEL ANGEL, I. Z.; GARCÍA-PÉREZ, E.; HERNÁNDEZ, D. G.; PÉREZVÁZQUEZ, A.; RESÉNDIZ, C. Á. Genetic Diversity of *Jatropha curcas* L. in Veracruz State, Mexico, and its Relationships with the Content of Phorbol Esters. **Global Advanced Research Journal of Agricultural Science**, v. 5, n. 5, p. 149–158, 2016.
- DIAS, L. A. S.; LEME, L. P.; LAVIOLA, B. G.; PALLINI, A.; PEREIRA, O. L.; CARVALHO, M.; MANFIO, C. E.; SANTOS, A. S.; SOUSA, L. C. A.; OLIVEIRA, T. S.; DIAS, D. C. F. S. **Cultivo de pinhão-mansô (*Jatropha curcas* L.) para produção de óleo combustível**. Viçosa-MG: Dias L. A. S., 2007.

- 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, n. 3, p. 2719–2728, 2012.
- DÍAZ, B. G.; ARGOLLO, D. M.; FRANCO, M. C.; NUCCI, S. M.; SIQUEIRA, W. J.; LAAT, D. M. de; COLOMBO, and C. A. High genetic diversity of *Jatropha curcas* assessed by ISSR. **Genetics and Molecular Research**, v. 16, n. 2, p. 1–12, 2017.
- DINIZ, L. E. C.; SAKIYAMA, N. S.; LASHERMES, P.; CAIXETA, E. T.; OLIVEIRA, A. C. B.; ZAMBOLIM, E. M.; LOUREIRO, M. E.; PEREIRA, A. A.; ZAMBOLIM, L. Analysis of AFLP Markers Associated to the Mex-1 Resistance Locus in Icatu Progenies. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 5, n. 4, p. 387–393, 2005.
- EARL, D. A.; VONHOLDT, B. M. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. **Conservation Genetics Resources**, v. 4, n. 2, p. 359–361, jun. 2012.
- EDRISI, S. A.; DUBEY, R. K.; TRIPATHI, V.; BAKSHI, M.; SRIVASTAVA, P.; JAMIL, S.; SINGH, H. B.; SINGH, N.; ABHILASH, P. C. *Jatropha curcas* L.: A crucified plant waiting for resurgence. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.41, p. 855-862, 2015.
- EVANGELISTA, A. W. P.; SILVA, J. C. da. Yield oil of *Jatropha curcas* seeds of trees irrigated and fertilized. **Bioscience Journal**, v. 29, n. 1, p. 1624–1631, 2013.
- EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. **Molecular Ecology**, v. 14, n. 8, p. 2611–2620, 2005.

- EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P. E.; QUATTRO, J. M. Analysis of Molecular Variance Inferred from Metric Distances among DNA Haplotypes: Application to Human Mitochondrial DNA Restriction Data. **Genetics**, v. 131, n. 2, p. 479–491, jun. 1992.
- FRANCIS, G.; EDINGER, R.; BECKER, K. A concept for simultaneous wasteland reclamation, fuel production, and socio-economic development in degraded areas in India: Need, potential and perspectives of *Jatropha* plantations. **Natural Resources Forum**, v. 29, n. 1, p. 12–24, 2005.
- FREITAS, R. G. **Avaliação e Seleção de Genótipos de *Jatropha curcas* L.** 2015. Universidade Federal de Viçosa, 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**, v. 15, n. 1, p. 1–10, 2016.
- GRATIVOL, C.; DA FONSECA LIRA-MEDEIROS, C.; 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.
- KIMURA, M.; CROW, J. F. The number of alleles that can be maintained in a finite population. **Genetics**, v. 49, n. 4, p. 725–738, 1964.
- KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. **Molecular Biology and Evolution**, v.33,

- p. 1870-1874, 2016.
- LAVIOLA, B. G.; RODRIGUES, E. V.; TEODORO, P. E.; DE AZEVEDO PEIXOTO, L.; BHERING, L. L. Biometric and biotechnology strategies in *Jatropha* genetic breeding for biodiesel production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 76, p. 894–904, 2017.
- LEWONTIN, R. C. The Apportionment of Human Diversity. In: DOBZHANSKY, T.; HECHT, M. K.; STEERE, W. C. (Ed.). **Evolutionary Biology: Volume 6**. Boston, MA: Springer US, p. 381–398, 1995.
- MAURYA, R.; GUPTA, A.; SINGH, S. K.; RAI, K. M.; CHANDRAWATI; 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, jun. 2015.
- MAVUSO, C.; WU, Y.-P.; CHEN, F.-C.; HUANG, B.-H.; LIN, S.-J. Genetic diversity analysis of *Jatropha curcas* L. accessions cultivated in Taiwan using inter simple sequence repeats (ISSR) markers. **Agroforestry Systems**, v. 90, n. 3, p. 417–431, 2016.
- MONTES, J. M.; TECHNOW, F.; MARTIN, M.; BECKER, K. Genetic diversity in *Jatropha curcas* L. assessed with SSR and SNP markers. **Diversity**, v. 6, n. 3, p. 551–566, 2014.
- NEI, M. Genetic Distance between Populations. **The American Naturalist**, v. 106, n. 949, p. 283–292, 1 maio 1972.
- NEI, M. Analysis of Gene Diversity in Subdivided Populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 70, n. 12 Pt 1-2, p. 3321–3323, dez. 1973.
- NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number

- of individuals. **Genetics**, v. 89, n. 3, p. 583-590, 20 jul. 1978.
- ONE, K. T.; TANYA, P.; MUAKRONG, N.; LAOSATIT, K.; SRINIVES, P.
Phenotypic and genotypic variability of F2 plants derived from *Jatropha curcas* ×
integerrima hybrid. **Biomass and Bioenergy**, v. 67, p. 137–144, 2014.
- OVANDO-MEDINA, I.; SÁNCHEZ-GUTIÉRREZ, A.; ADRIANO-ANAYA, L.;
ESPINOSA-GARCÍA, F.; NÚÑEZ-FARFÁN, J.; SALVADOR-FIGUEROA, M.
Genetic diversity in *Jatropha curcas* populations in the State of Chiapas, Mexico.
Diversity, v. 3, n. 4, p. 641–659, 2011.
- 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.
- PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population
structure using multilocus genotype data. **Genetics**, v. 155, n. 2, p. 945–959, jun.
2000.
- SAKIYAMA, N. S.; RAMOS, H. C. C.; CAIXETA, E. T.; PEREIRA, M. G. . Plant
breeding with marker-assisted selection in Brazil. **Crop Breeding and Applied
Biotechnology**, v. 14, p. 54–60, 2014.
- SALVADOR-FIGUEROA, M.; MAGAÑA-RAMOS, J.; VÁZQUEZ-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:**

- Characterization and Utilization**, v. 13, n. 1, p. 9–17, 2014.
- SANTOS, D. N. D. O. S.; FERREIRA, J. L.; SETOTAW, T. A.; CANÇADO, G. M. A.; PASQUAL, M.; LONDE, L. C. N.; SATURNINO, H. M.; VENDRAME, W. A. Genetic structure from the oldest *Jatropha* germplasm bank of Brazil and contribution for the genetic improvement. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 88, p. 2363–2374, 2016.
- SOUSA, R. L. **Variabilidade Genética em famílias de *Jatropha curcas* L. por Marcadores SSR**. 2015. Universidade Federal de Viçosa, 2015.
- SOUZA, R. L.; DIAS, L. A. S.; CORRÊA, T. R.; CAIXETA, E. T.; FERNANDES, E. C.; SILVA, D. R. M.; ROSMANINHO, L. B. C. Wide genetic diversity revealed by microsatellite marker in a large germplasm collection of *Jatropha curcas* L. in Brazil: an important plant for biofuels. **Industrial Crops and Products**. No prelo.
- SUDHEER PAMIDIMARRI, D. V. N.; SINGH, S.; MASTAN, S. G.; PATEL, J.; REDDY, M. P. Molecular characterization and identification of markers for toxic and non-toxic varieties of *Jatropha curcas* L. using RAPD, AFLP and SSR markers. **Molecular Biology Reports**, v. 36, n. 6, p. 1357–1364, 2009.
- TOPPA, E. V. B.; JADOSKI, C. J. O uso dos marcadores moleculares no melhoramento genético de plantas. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 12, n. 1, p. 1–5, 2013.
- VÁSQUEZ-MAYORGA, M.; FUCHS, E. J.; HERNÁNDEZ, E. J.; HERRERA, F.; HERNÁNDEZ, J.; MOREIRA, I.; ARNÁEZ, E.; BARBOZA, N. M. Molecular characterization and genetic diversity of *Jatropha curcas* L. in Costa Rica. **PeerJ**, v. 5, e2931, 20 set. 2017.
- WEN, M.; WANG, H.; XIA, Z.; ZOU, M.; LU, C.; WANG, W. Developmenrt 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.

WRIGHT, S. **Evolution and Genetics of Populations**. Chicago: University of Chicago, 1978.

YEH, F. C.; BOYLE, J. . POPGENE, the user-friendly shareware for population genetic analysis. **Molecular Biology and Biotechnology**, v. 434, p. 724–31, 1997.