



DALILIA NAZARÉ DOS SANTOS

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE PINHÃO-
MANSO (*Jatropha curcas* L.) POR MEIO DE
CITOMETRIA DE FLUXO E MARCADORES
MOLECULARES**

LAVRAS - MG

2012

DALILIA NAZARÉ DOS SANTOS

CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE PINHÃO-MANSO (*Jatropha curcas* L.) POR MEIO DE CITOMETRIA DE FLUXO E MARCADORES MOLECULARES

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, área de concentração Produção Vegetal, para obtenção do título de Doutor.

Orientador

Dr. Moacir Pasqual

Coorientador

Dr. Geraldo Magela de Almeida Cançado

LAVRAS - MG

2012

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Santos, Dalíhíá Nazaré dos.

Caracterização genética de pinhão-mansó (*Jatropha curcas* L.)
por meio de citometria de fluxo e marcadores moleculares / Dalíhíá
Nazaré dos Santos. – Lavras : UFLA, 2012.

84 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2012.

Orientador: Moacir Pasqual.

Bibliografia.

1. SSR. 2. ISSR. 3. Características genéticas. 4. Diversidade
genética. 5. Variabilidade genética. I. Universidade Federal de
Lavras. II. Título.

CDD – 633.85

DALILHIA NAZARÉ DOS SANTOS

CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE PINHÃO-MANSO (*Jatropha curcas* L.) POR MEIO DE CITOMETRIA DE FLUXO E MARCADORES MOLECULARES

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/ Fitotecnia, área de concentração Produção Vegetal, para obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 6 de setembro de 2012

Dr. Juliano Lino Ferreira	EMBRAPA
Dr. Evaristo Mauro de Castro	UFLA
Dr. Rafael Pio	UFLA

Orientador

Dr. Moacir Pasqual

Coorientador

Dr. Geraldo Magela de Almeida Cançado

LAVRAS – MG

2012

A Deus, à minha família e aos meus amigos, pelo amor e confiança.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por ser meu amigo, me auxiliando nas escolhas e me confortando nas horas difíceis.

À Universidade Federal de Lavras, à EPAMIG, à University of Florida, à FAPEMIG, ao CNPq, à CAPES e à sociedade brasileira, pela oportunidade de estudo.

Ao meu orientador Prof. Moacir Pasqual, agradeço pela confiança depositada, me oferecendo liberdade de decisões e apoio a todas. Agradeço por ter sido minha segurança!

Aos meus coorientadores Dr. Geraldo M. A. Cançado e Dr. Wagner A. Vendrame, agradeço por terem me recebido tão generosamente em seus laboratórios e por acreditarem no meu trabalho.

Aos demais membros da banca: Ao Dr. Juliano L. Ferreira, agradeço pela presença cotidiana, revisando minuciosamente minhas atividades, mesmo quando estive no exterior, obrigada pela amizade. Ao Prof. Evaristo M. Castro e ao Prof. Rafael Pio, obrigada pela disponibilidade na avaliação deste trabalho.

As pesquisadoras da EPAMIG de Janaúba, Dr^a. Heloísa Mattana Saturnino e Dr^a. Luciana Londe, por coletarem e cederem as amostras de pinhão-manso utilizadas neste trabalho.

Aos laboratoristas Vantuil, Claret e Alba, pelo conhecimento, entretenimento, bondade e carinho.

A todos os colegas e amigos do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais (UFLA), Laboratório de Biotecnologia Vegetal (EPAMIG) e ao Laboratory of Ornamental Horticulture (University of Florida), por tornarem meu dia a dia mais agradável.

Às amigas/irmãs Cata, Cinara, Dani, Helena, Joyce, Leila, Lucília, Néia, Pauline, Thaís e Verônica pela amizade sincera e pelos momentos de incentivo.

Agradeço de forma especial a minha família. Pai, obrigada por acreditar que o estudo é a melhor herança que poderia nos deixar. Mãe, obrigada pelo amor e paciência, pois sei que a faço sofrer com minhas idas e vindas da vida acadêmica. Obrigado por ter nos criado para o mundo, os amo muito!

Aos meus irmãos: Vanilha, a irmã mais velha que se importa com todos, aquela que sofreu tudo primeiro, que foi a desbravadora do caminho que seguimos depois. Obrigada por nos amar e nos cuidar mesmo em meio a ocupação diária de sua vida. Danilo, o irmão mais novo que não foi mimado, pelo contrário, tem a postura do homem da casa, obrigada por ser meu companheiro e sempre me alegrar com suas colocações bem humoradas. Por vocês tenho o amor mais puro e incondicional!

Aos novos membros da família, meu cunhado Eder e meu sobrinho Yuri, obrigado por tornarem minha família maior e melhor!

Enfim, obrigado aos antigos, aos atuais e aos novos amigos, amigos de Bom Sucesso, Graduação, Mestrado, Doutorado no Brasil e no exterior. Obrigado a todos que direta ou indiretamente tiveram participação na minha formação. Dizer-lhes obrigado nesse momento me parece insuficiente, mas o faço com o mais genuíno sentimento de gratidão.

Muito Obrigada!

*Por amor a uma família lavradora,
Resolvi me graduar doutora.
A profissão que escolhi foi a Agronomia,
Que me traz satisfação todo dia!*

*Afinal, vidas diariamente têm que recomeçar,
Através de um verbo –“alimenta”!
Suprido pela fotossíntese, que indiretamente é manipulada,
Por um lavrador ou um doutor, que ama a Ciência Agrária!*

Dalíhnia N. Santos

RESUMO

O pinhão-manso (*Jatropha curcas L.*) é uma oleaginosa que tem despertado o interesse de produtores, governos e instituições de pesquisa, visando ao desenvolvimento de tecnologia que possibilite sua utilização como cultura agroenergética. Dentre as tecnologias que vêm a contribuir, a citometria de fluxo e os marcadores moleculares são capazes de inferir sobre características genéticas do pinhão-manso sem a interferência de fatores ambientais. Sendo assim, objetivou-se caracterizar geneticamente o germoplasma mantido pela EPAMIG de Nova Porteirinha. Inicialmente, estudou-se a variabilidade no genoma do pinhão-manso por meio de citometria de fluxo. Posteriormente, marcadores SSR e ISSR foram aplicados para mensurar a diversidade genética entre 48 genótipos de *Jatropha* e marcadores SSR foram aplicados para detectar a variabilidade em progênies de meios-irmãos de pinhão-manso obtidos de fecundação aberta no campo. Por citometria de fluxo, marcadores SSR e ISSR detectou-se reduzida variabilidade genética entre os genótipos de pinhão-manso do germoplasma da EPAMIG de Nova Porteirinha.

Palavras-chave: Diversidade Genética. Banco de Germoplasma. SSR. ISSR.

ABSTRACT

The physic nut (*Jatropha curcas* L.) is an oilseed crop that has been catching the attention of producers, governments, and research institutions aiming to develop a technology which allows its use as an agroenergy crop. Flow cytometry and molecular markers are technologies that are able to infer genetic characteristics of the physic nut without interference from environmental factors. Therefore, the objective of this study was to perform a genetic characterization of the germplasm maintained by EPAMIG from Nova Porteirinha. The variability in the physic nut genome was initially studied by flow cytometry. Later, SSR and ISSR markers were used in order to measure the genetic variability among 48 genotypes of *Jatropha*. SSR markers were used in order to detect the variability in half-siblings progenies obtained through pollination in the field. Flow cytometry, SSR, and ISSR markers detected reduced genetic variability among the genotypes of physic nut in the germplasm of EPAMIG from Nova Porteirinha.

Keywords: Genetic Diversity. Germoplasm Bank. SSR. ISSR.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1	Histórico geral.....	14
2.2	Histórico no Brasil.....	15
2.3	Discussão sobre centro de diversidade	16
2.4	Produção	18
2.5	Biologia floral.....	19
2.5.1	Morfologia floral.....	20
2.5.2	Desenvolvimento floral.....	20
2.5.3	Fecundação	22
2.5.4	Apomixia.....	24
2.6	Sistema de reprodução e fluxo gênico.....	25
2.7	Propagação assexuada.....	26
2.8	Bancos de germoplasma	27
2.9	Melhoramento aplicado ao pinhão-manso.....	29
2.10	Citometria de fluxo.....	30
2.11	Marcadores moleculares aplicados ao pinhão-manso.....	31
2.11.1	SSR (<i>Simple Sequence Repeats</i>) ou microssatélite.....	32
2.11.2	ISSR (<i>Inter Simple Sequence Repeats</i>).....	33
3	MATERIAL E MÉTODOS	36
3.1	Material vegetal	36
3.1.1	Caracterização genômica do germoplasma norte mineiro de pinhão-manso.....	36
3.1.2	Diversidade genética no germoplasma norte mineiro de pinhão-manso.....	36
3.1.3	Teste de diversidade entre progênies do germoplasma norte mineiro de pinhão-manso.....	37
3.2	Citometria de fluxo.....	38
3.3	Extração de DNA	39
3.4	Análises com marcadores moleculares.....	41
3.4.1	SSR.....	41
3.4.2	ISSR.....	43
3.5	Análises dos dados.....	44
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
4.1	Caracterização genômica do germoplasma norte mineiro de pinhão-manso.....	46
4.2	Diversidade genética no germoplasma norte mineiro de pinhão-manso.....	48
4.2.1	SSR.....	48
4.2.2	ISSR.....	55

4.3	Teste de diversidade entre progênies do germoplasma norte mineiro de pinhão-manso.....	62
4.4	Discussão sobre o germoplasma norte mineiro de pinhão-manso.....	66
4.5	Discussão sobre a baixa variabilidade genética do pinhão-manso.....	68
4.5.1	Sistema reprodutivo.....	68
4.5.2	Apomixia.....	68
4.5.3	Evolução.....	69
5	CONCLUSÃO.....	72
	REFERÊNCIAS	73

1 INTRODUÇÃO

O pinhão-manso, planta oleaginosa pertencente à família euforbiácea, ganha nos últimos cinco anos o status de provável cultura agroenergética. Trata-se de uma espécie amplamente estudada na África, Ásia e América tropical, a exemplo de Brasil, México e sudeste dos Estados Unidos.

O pinhão-manso é atrativo ao Programa de Biocombustíveis Brasileiro, por ser uma das únicas oleaginosas que não compete diretamente com a agricultura de alimentos. Outro atrativo é que o pinhão-manso possui maior eficiência no uso da água dentre as culturas agroenergéticas disponíveis. Esse diferencial se deve à rara capacidade de combinar os metabolismos C3 e CAM conforme a disponibilidade de água no solo. Seu caule mantém o metabolismo CAM, enquanto folhas o alternam entre C3 e CAM. A mudança de metabolismo ocorre nas folhas, pois estas vivem o dilema de fechar estômato para evitar perda de água ou abri-lo para permitir o suprimento de CO₂ à fotossíntese (CRUZ, 2010; TING; STERNBERG; DENIRO, 1983). Com esta estratégia, o pinhão-manso resiste eficientemente a períodos de seca.

Apesar das inúmeras potencialidades do pinhão-manso, diversos fatores devem ser solucionados para completa domesticação da espécie. Dentre esses fatores, é necessária a caracterização genética da espécie partindo dos bancos de germoplasma disponíveis.

Dentre as coleções brasileiras de pinhão-manso, atenção deve ser dada à da região norte do estado de Minas Gerais, pois, segundo Dias, Missio e Dias (2012), é razoável supor que essa região do estado de Minas Gerais possa ser um importante centro de diversidade do pinhão-manso, em função da elevada variabilidade observada em caracteres agronômicos da espécie nessas condições.

Dentre as ferramentas que podem contribuir para a caracterização genética dos BAGs (Bancos de Germoplasma) de pinhão-manso, tem-se a

citometria de fluxo e os marcadores moleculares. A citometria de fluxo pode contribuir para a compreensão da biodiversidade do genoma (BENNET; LEITCH, 1997), enquanto os marcadores poderiam refinar essa biodiversidade mensurada.

Entre os marcadores moleculares disponíveis, os marcadores microssatélite ou SSR (*Simple Sequence Repeats*) são amplamente utilizados, bem como o ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*). A principal particularidade entre estes dois marcadores é que o SSR é um marcador co-dominante e multialélico, enquanto o ISSR é dominante e multiloco. A combinação de ambos, portanto, pode proporcionar uma inferência mais precisa com relação à diversidade genética exibida por uma dada espécie.

O presente trabalho objetivou caracterizar geneticamente a coleção de pinhão-mansão da EPAMIG de Nova Porteirinha, mensurando a diversidade de acordo com o conteúdo relativo de DNA do pinhão-mansão por citometria de fluxo, bem como a diversidade genética entre 48 genótipos de *Jatropha*, por meio de marcadores moleculares SSR e ISSR e a variabilidade entre progênies de meios-irmãos de pinhão-mansão por marcadores SSR.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Histórico geral

A etimologia da palavra *Jatropha* derivada da palavra grega *jatros*, que significa médico, e *trophe*, que significa nutrição ou alimentos, indica seu amplo espectro de utilização medicinal nos tempos antigos (SURWENSHI et al., 2011) e atuais pela transmissão do conhecimento popular.

Dias, Missio e Dias (2012) fizeram um levantamento da antiguidade da cultura do pinhão-manso em diversas literaturas. Segundo os autores, o pinhão-manso é uma planta medicinal e, além do mais, permitia a confecção de mapas de navegação, pois sua pigmentação advinha de um inseto específico do pinhão-manso. A planta era utilizada pelos Olmecas, responsáveis por influenciar culturas subsequentes como Maias e Astecas, a aproximadamente 1500-3000 anos A.C. Portanto, essas populações da Mesoamérica já conheciam e cultivavam o pinhão-manso.

Segundo Ovando-Medina et al. (2011), o pinhão-manso foi naturalizado em muitas áreas tropicais e subtropicais, incluindo Índia, África, sudeste da Ásia, América do sul e Estados Unidos. Inicialmente, a dispersão se deu por navegantes portugueses, os quais disseminaram o pinhão-manso do seu centro de diversidade para as ilhas africanas de Cabo Verde e posteriormente a Guiné-Bissau. Assim, culminaram por espalhar o pinhão-manso por toda a África e posteriormente para as regiões quentes da Ásia, a cerca de 400 anos atrás (HELLER, 1996). A dispersão para América do norte e sul ainda não está bem elucidada.

É uma planta largamente utilizada no México, principalmente por aspectos medicinais e alimentares, pois há relatos que as folhas novas, desde que cozida no vapor ou em ensopados, são comestíveis. Os mexicanos alimentam-se

também de sementes assadas ou cozidas, pois no México há genótipos isentos de ésteres de forbol, ou seja, atóxicos. Tal hábito é corrente somente nesta região, pois, nas plantas de pinhão-manso dos demais países, há relatos de envenenamento (ABDU-AGUYE et al., 1986).

2.2 Histórico no Brasil

O uso do óleo de pinhão-manso no Brasil é relatado no documento do Ministério da Indústria e Comércio de 1985, no qual é descrito que já havia a produção de combustível líquido a partir do óleo de pinhão-manso (BRASIL, 1985). Esse documento também relata que a espécie era conhecida no Brasil desde as épocas pré-colombianas, ou seja, pelas civilizações que aqui viviam antes à chegada dos europeus. Segundo Brasil (1985), o óleo de pinhão-manso foi usado nas lamparinas das ruas do Rio de Janeiro no século XIX, como mecanismo de iluminação pública (CORRÊA, 1952; DRUMMOND et al., 1984). Segundo Drummond et al. (1984), há relatos dos quilombolas de que a planta era utilizada pelos ancestrais, para fabricação de sabão e purgante na região do Vale do Ribeira (SP). Já Emperaire e Pinto (1986) registraram o quão eram comuns plantios de pinhão-manso ao redor de casas no sudeste do Piauí, para a proteção contra infortúnios, fato que se repetiu e mantém-se comum até os dias atuais, na região norte de Minas Gerais.

O primeiro registro do pinhão-manso em literatura brasileira se dá pela publicação do Ministério da Agricultura na década de 50, em “Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas” (CORRÊA, 1952), mas há somente uma menção à planta. Na mesma década já é feita referência ao pinhão-manso como cultura em “Culturas tropicais: Plantas oleaginosas, coqueiro, rícino e purgueira”, sendo citado aqui como purgueira, outro nome popular (CORTEZÃO, 1957). Na década de 70, fica registrada a manutenção do

interesse no pinhão-mansão como cultura oleaginosa, quando faz parte do livro “Plantas oleaginosas arbóreas” (PEIXOTO, 1973). Diante do evidente interesse, a Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG) conduziu pesquisas com o pinhão-mansão, instalando o primeiro banco de germoplasma brasileiro da espécie e estudando seu comportamento a campo, visando ao estabelecimento do pinhão-mansão como cultura. Tal intuito foi bem sucedido, culminando ao final da década de 80 com a publicação “A cultura do Pinhão-mansão” (DRUMMOND et al., 1984).

O pinhão-mansão, por algumas décadas, foi considerado uma cultura oleaginosa a ser estabelecida no Brasil. No entanto, não veio a ser próspero, pois o petróleo se configurava como uma opção mais viável. O petróleo, porém, vem apresentando crises de valores no decorrer da história como em 1973, 1979, 2008 e atualmente, devido aos recentes conflitos nos países do Oriente Médio. O preço do barril de petróleo flutuou de US\$15 a 120 dólares e se encontra hoje a US\$100 em média.

Com os ciclos de baixa nos valores do barril de petróleo, a postura era desacreditar na necessidade de investimentos em fontes alternativas de energia. Com a última crise de 2008, porém, os governos perceberam que esta conjuntura era um caminho sem volta, já que o recurso é não renovável e então as pesquisas mundiais em agroenergia deslancharam. No Brasil estavam estagnadas, mas em 2004 foi estabelecido o Programa Nacional de Produção e Uso de Biocombustível (PNPB) do Governo Federal, impulsionando os trabalhos em biocombustíveis e reavivando as pesquisas com pinhão-mansão.

2.3 Discussão sobre centro de diversidade

Na literatura há grande controvérsia sobre a origem do pinhão-mansão. Vários autores citam o assunto em seus artigos por meio das seguintes

colocações: O pinhão-manso é nativo da América do Sul e Central (AMBROSI et al., 2010); nativo do México e América Central (CHEN et al., 2011; NA-EK et al., 2011; PECINA-QUINTERO et al., 2011; SHARMA; CHAUHAN, 2011); nativo da América Central (PAMIDIMARRI et al., 2011) originário da América Central (TANYA et al., 2011; WANG et al., 2011); originário da América Latina (KUMAR et al., 2011). Há autores que consideram o Brasil como centro de origem da espécie, como Arruda et al. (2004), Martin e Mayeux (1984) e Ovando-Medina et al. (2011), sendo que estes primeiros são mais precisos ao mencionarem o estado do Ceará como centro de origem do pinhão-manso.

Dias, Missio e Dias (2012) consideram pouco provável a origem brasileira no Ceará, visto que o pinhão-manso é encontrado nestas regiões somente em associação com o homem, a poucos metros de zonas urbanas e/ou casas, perto de zonas rurais como planta isolada ou cerca-viva. Segundo os autores, nestas regiões não há registro do pinhão-manso se reproduzindo em estado selvagem. Portanto, ainda não se sabe ao certo se trata-se de uma espécie introduzida que se adaptou às condições ambientais locais, como é o caso da *Brachiaria*.

Uma informação mais precisa é quanto ao centro de diversidade do pinhão-manso que, segundo Ovando-Medina et al. (2011), provavelmente se trata da região denominada como Mesoamerica, por compreender México e América Central. Essa afirmação se embasa no fato de que, das 175 espécies de *Jatropha*, 100 são nativas dessa região e no México, por exemplo, existem 41 espécies nativas, sendo que 31 são endêmicas desse território (DEHGAN; WEBSTER, 1979; JIMÉNEZ; MARTINEZ, 1994).

Dias, Missio e Dias (2012) são enfáticos ao afirmarem que o centro de origem e de domesticação do pinhão-manso não pode ser situado em outra parte do mundo a não ser o México. Primeiro, porque não há registros do uso do pinhão-manso e seus produtos anteriores aos Olmecas, no México. Segundo,

porque genótipos não tóxicos só existem naquele país, provavelmente selecionados pelos Maias, os quais pretendiam, como característica principal, a redução de toxicidade a fim de tornar grãos e óleo comestíveis.

O que se pode observar nestas informações é que os citados centros de origem, domesticação ou diversidade compartilham região equivalente. Como se sabe, muitas espécies têm o centro de diversidade e centro de origem em comum. Talvez este seja também o caso do pinhão-manso. Para esclarecimento das suposições, uma pesquisa mais aprofundada sobre o assunto é necessária e Ovando-Medina et al. (2011) aconselha a utilização de caracteres morfológicos e moleculares na condução de pesquisas filogeográficas com o pinhão-manso.

2.4 Produção

Já em 1911, Rudolf Diesel, inventor do motor a diesel, fez a seguinte declaração em uma carta: “Geralmente nos esquecemos de que os óleos vegetais e animais podem ser usados diretamente em motores a diesel.” Desabafo feito porque em 1900, numa feira de automóveis de Paris, sua equipe apresentou um motor diesel funcionando com óleo de amendoim (HELLER, 1996). Rudolf Diesel adotou o biodiesel, no entanto, ao decorrer dos anos, a oferta de petróleo aumentou, reduzindo conseqüentemente os preços. Tal fato determinou, nos anos seguintes, que este fosse o combustível preferido.

O petróleo, no entanto, vem ao longo dos anos apresentando um comportamento sigmoide no mercado financeiro, de alta e queda de valores. Exaustos da dependência financeira por esta matéria prima, governos estabeleceram definitivamente a produção de fontes alternativas de energia como o bioetanol e o biodiesel. O estímulo ao biodiesel, logicamente, incentiva a produção de pinhão-manso.

A capacidade produtiva do pinhão-mansão foi estudada por diversos autores ao longo do tempo em território nacional e, segundo Brasil (1985), esta é função dos tratamentos culturais. Esse mesmo autor estudou a capacidade produtiva do pinhão-mansão e identificou que ela varia de 3.000 a 4.000 Kg/ha de semente. Por ocasião próxima, Purcino e Drummond (1986) identificaram capacidade produtiva menor, em torno de 2.000 Kg/ha de semente. Mais recentemente, a produtividade foi superiormente avaliada, em torno de 5.000 Kg/ha de semente (ARRUDA et al., 2004; SATURNINO et al., 2005; TEIXEIRA, 2005). Em plantas com apenas 12 meses de idade foi identificada uma produtividade de 3.542 Kg/ha de semente (DRUMOND et al., 2009). Como os plantios experimentais de pinhão-mansão são recentes, em torno de 5 anos, a literatura não menciona dados mais atuais de produtividade de sementes ou produção de óleo. Os disponíveis são mera citação de autores anteriores. No mundo a capacidade produtiva do pinhão-mansão é mais descrita em teor de óleo, sendo na Índia de 58,12% (GINWAL et al., 2005), Nigéria 47,25-66,4% (ADEBOWALE; ADEDIRE, 2006; AKINTAYO, 2004), Nicarágua 52,9-57,4% (FOIDL et al., 1996), Malásia 63,16% (EMIL et al., 2009) e China 51,3-61,2% (YE et al., 2009).

2.5 Biologia floral

O conhecimento do sistema reprodutivo de uma planta é fundamental, pois define estratégias de reprodução e melhoramento genético. O pinhão-mansão se trata de uma planta ainda rústica ao cultivo, pois conhecimentos agrônômicos relativos a esta espécie ainda são escassos. Oficialmente, não se tem qualquer cultivar de pinhão-mansão registrada no Brasil, justamente porque aspectos simples, como sua biologia reprodutiva, ainda não foram suficientemente

esclarecidos. Por isso o pinhão-manso vive atualmente a fase de pré-melhoramento, onde tais informações estão sendo elucidadas.

2.5.1 Morfologia floral

A determinação da morfologia floral é uma característica importante para os futuros trabalhos de melhoramento, pois define quais metodologias desta área do conhecimento poderão ser ou não empregadas no pinhão-manso, a exemplo da emasculação de flores, no controle de fecundação.

Chang-Wei et al. (2007) determinaram que a inflorescência do pinhão-manso ocorre em dicásio. Segundo Kaur, Dhillon e Gill (2011), estas inflorescências possuem flores unissexuais e normalmente produzem uma flor central feminina rodeada por um grupo de flores masculinas. As flores são facilmente diferenciadas na fase de botão floral, pois a flor masculina apresenta-se arredondada e com pedicelo pequeno, enquanto a flor feminina apresenta-se de forma cônica, sépalas longas com pedicelo longo e espesso. As flores masculinas são pequenas e apresentam 10 estames dispostos em duas fileiras de cinco cada, livres na base e unidos na parte superior. As flores femininas são relativamente maiores que as masculinas e possuem três estilos e três estigmas, sendo este último bifurcado.

Dehgan (1984) e Juhász et al. (2009) relatam a presença, ainda que rara, de flores andróginas (hermafroditas) em pinhão manso. No entanto, Paiva Neto et al. (2010) não detectaram qualquer flor andrógina nas plantas da área experimental.

2.5.2 Desenvolvimento floral

O desenvolvimento floral do pinhão-mansão foi estudado por Wu et al. (2011). Este ocorre em 12 fases e na sétima ocorre a diferenciação sexual de flores femininas e masculinas. A flor masculina possui tecidos unissexuais durante todo o desenvolvimento floral enquanto as flores femininas apresentam tecidos bissexuais. Com o decorrer das fases de desenvolvimento haverá ou não a degradação do tecido sexual masculino em função de fatores ambientais como precipitação e temperatura, definindo se a flor feminina será feminina ou masculina, devido à ação de genes homeóticos, que são aqueles responsáveis pela coordenação dos processos de desenvolvimento.

A tendência da flor feminina é se desenvolver em flor feminina, mas caso impere alguma condição ambiental que desencadeie a ação dos genes homeóticos, estes ocasionarão uma restrição ao desenvolvimento do gineceu e a flor feminina bissexual passa a flor masculina.

Segundo Chang-Wei et al. (2007), a proporção de flores femininas e masculinas varia entre as populações em função de condições nutricionais e climáticas. Mesmo argumento é usado por Juhász et al. (2009), que explica que isso ocorre por ser esta característica muito variável, a qual depende do material genético, da região, do clima, dos tratamentos culturais, entre outros fatores. Wu et al. (2011) são mais específicos com relação a essa questão. Os autores explicam que inflorescências estritamente femininas e mistas ocorrem em condições de precipitação e temperatura adequadas. A precipitação em níveis adequados irá definir maior número de flores femininas por inflorescência, enquanto excesso ou déficit hídrico ocasiona decréscimo destas. A temperatura tem influência por seus baixos níveis que irão ocasionar o período de dormência na planta e logo depois há o desenvolvimento das gemas vegetativas. Ocorrendo o número de horas de frio adequado, as flores femininas se desenvolverão em maior proporção. O próximo passo é mensurar em valores a temperatura e precipitação que beneficiam a formação de flores femininas, pois, como se sabe, a proporção

de flores femininas nas plantas é uma característica importante, pois define produtividade. Afinal, flores femininas fecundadas e desenvolvidas refletem no produto a ser comercializado, as sementes.

2.5.3 Fecundação

Para melhor esclarecimento da fecundação da espécie *Jatropha curcas*, Chang-Wei et al. (2007) testaram a polinização artificial (por ensacamento) e autofecundação (por emasculação) e observaram o prevaecimento de fecundação por cruzamento no pinhão-manso. Juhász et al. (2009) fizeram avaliações da fecundação em pinhão-manso no Brasil e observaram que os frutos formados por polinização artificial e natural, ou seja, por xenogamia, somaram 88% de frutificação. O pleno desenvolvimento de frutos xenogâmicos também foi observado por Raju e Ezradanam (2002). Estes autores observaram também que, dos frutos geitonogâmicos formados, 23% sofreram aborto antes de completar o desenvolvimento total. Os frutos geitonogâmicos são aqueles formados por outras flores na mesma planta, ou seja não é possível em plantas dioicas, somente em monoicas como é o caso do pinhão-manso e mamona.

Ainda pelo trabalho de Juhász et al. (2009), foi observado que as sementes produzidas por polinização artificial ou natural tiveram germinação em torno de 94 a 99%, enquanto as de autofecundação espontânea tiveram a germinação reduzida em 50% em relação aos tipos anteriores. Quando observada a autofecundação manual, 85% das flores produziram frutos, no entanto os autores são enfáticos ao afirmar que as chances de que esse fato ocorra na natureza são pequenas, pois raramente são encontradas flores femininas e masculinas abertas, concomitantemente, numa mesma inflorescência. Uma prova da veracidade desta informação foi a medição da porcentagem de flores que formam frutos por autofecundação espontânea. Por

avaliação, percebeu-se que apenas 20% das flores femininas desenvolveram frutos. Além disso, os frutos foram significativamente mais leves, com menor número de sementes por fruto, menor comprimento e largura de sementes. Estas sementes apresentaram, ainda, redução no índice de velocidade de emergência, em relação aos outros tipos de polinização. Assim sendo, os autores perceberam que, mesmo que haja formação de frutos por autofecundação, tanto os frutos quanto as sementes são de qualidade inferior quando comparado aos formados por cruzamento.

O trabalho mais recente realizado sobre fecundação em pinhão-manso foi o desenvolvido na Índia por Kaur, Dhillon e Gill (2011). Os autores averiguaram tanto a polinização cruzada quanto a autopolinização obtendo 93% e 72% de frutificação, respectivamente. O dado de polinização cruzada foi o mais alto relatado, mas ainda assim coerente com a literatura (CHANG-WEI et al., 2007; JUHÁSZ et al., 2009; RAJU; EZRADANAM, 2002), enquanto em relação à elevada frutificação por autopolinização, cabem as mesmas explicações anteriores, ou seja, pouco provável espontaneamente e com formação de semente de baixa qualidade.

Por mais que seja possível realizar autofecundação em pinhão-manso e mesmo ocorrendo o desenvolvimento de frutos por geitonogamia, o que prevalece é a formação de frutos por xenogamia, pois é baixo o sincronismo na abertura de flores femininas e masculinas na mesma inflorescência (CHANG-WEI et al., 2007; JUHÁSZ et al., 2009; RAJU; EZRADANAM, 2002).

Na literatura há um trabalho que afirma que a geitonogamia pode ocorrer naturalmente nesta espécie, pois os autores tomam por base a autocompatibilidade floral do pinhão-manso (PAIVA NETO et al., 2010). No entanto, é um estudo com poucos dados pra sustentar a afirmação, ficando sem embasamento quando comparado aos fatos anteriormente apresentados.

2.5.4 Apomixia

O primeiro relato de apomixia em pinhão-manso foi publicado por Bhattacharaya, Kalyani e Subodh (2005), que detectaram 32% de frutificação, em plantas de pinhão-manso que estavam sob fecundação controlada na Índia. Na China, Chang-Wei et al. (2007) também observaram a ocorrência de 12% de formação de frutos por apomixia em pinhão-manso. No Brasil, Juhász et al. (2009) também estudaram a apomixia em plantas de pinhão-manso do norte do estado de Minas Gerais, no entanto valores inferiores foram encontrados, somente 5% de apomixia. A frutificação por apomixia mais recentemente relatada foi de 36,2 %, obtida nos estudos de fecundação de pinhão-manso na Índia por Kaur, Dhillon e Gill (2011).

Segundo a literatura, 75% dos registros de apomixia em todas as Angiospermas pertencem às famílias Asteraceae, Poaceae e Rosaceae, mas Nygren (1954) registrou a ocorrência de apomixia em diversas outras famílias, dentre elas a família Euphorbiaceae.

Diante da constatação fitotécnica da ocorrência de apomixia em pinhão-manso, a questão é determinar qual tipo de apomixia está em desenvolvimento nestas plantas. Segundo Asker e Jerling (1992), há dois tipos principais de apomixia, a gametofítica e a esporofítica. Dall'Agnol e Schifino-Wittmann (2005) explicam que a apomixia gametofítica é a mais comum, havendo a formação de um saco embrionário não reduzido (diploide), por dois caminhos diferentes: diplosporia ou aposporia. Em ambos haverá o desenvolvimento do embrião a partir da oosfera (partenogênese) ou, mais raramente, a partir das sinérgides ou antípodas (apogametia). O endosperma pode desenvolver-se também autonomamente, ou seja, somente a partir dos núcleos polares, ou pela união de um núcleo masculino com os núcleos polares (pseudogamia). Em apomíticos pseudogâmicos há, portanto, necessidade de polinização, mas apenas

para a formação do endosperma. Na outra forma de apomixia, a apomixia esporofítica também chamada de embrionia adventícia (comum em espécies de *Citrus*), não há formação de sacos embrionários, mas os embriões diplóides desenvolvem-se diretamente a partir de células dos envoltórios do óvulo (ASKER; JERLING, 1992).

Ambrosi et al. (2010) estudaram a apomixia em pinhão-mansinho por meio de citometria de fluxo. Pela medição do conteúdo de DNA, os autores garantem a não ocorrência de apomixia gametofítica na espécie, no entanto não descartam a ocorrência de apomixia esporofítica e recomendam análises cito-histológicas para elucidação desta incerteza. Segundo Werpachowski, Varassin e Goldenberg (2004), em espécies tropicais o mais comum é a ocorrência de embrionia adventícia, portanto, o pinhão-mansinho pode fazer parte deste contexto de plantas. Em outras espécies de *Jatropha*, como em *J. mutabilis* e *J. mollissima*, não foi observada a ocorrência de apomixia (SANTOS; MACHADO; LOPES, 2005).

2.6 Sistema de reprodução e fluxo gênico

Na natureza os sistemas de reprodução não são exatos. Uma planta alógama sempre tem uma taxa de autofecundação e vice versa. É comum em espécies arbóreas tropicais a ocorrência de sistema misto de reprodução, com predomínio de cruzamentos (taxa de 0,88), mesmo que parte dos cruzamentos ocorra entre aparentados (cruzamentos endogâmicos) e entre os mesmos indivíduos (cruzamentos biparentais), gerando progênies compostas por meios-irmãos, irmãos-completos e irmãos de autofecundação (MORITA, 2008; SEBBENN, 2002, 2003).

A avaliação do fluxo gênico em progênies de pinhão-mansinho poderá auxiliar na determinação do vínculo genético e mesmo mensurar qual sistema de reprodução está prevalecendo.

Fluxo gênico é a troca da informação genética entre espécies, por movimentação de pólen ou sementes, o qual pode ser mensurado de forma direta com base na observação da dispersão dos grãos de pólen ou das sementes, o que permite a estimativa do fluxo gênico potencial, pois nem todo pólen disperso fertiliza e nem toda semente dispersa germina.

Outros métodos diretos utilizam marcadores genéticos, e, nesse caso, pode-se estimar o fluxo gênico real. A exemplo tem-se o método descrito por Dow e Ashley (1998), no qual faz-se o uso de marcadores moleculares para identificar o pai de famílias de meios-irmãos ou identifica-se uma planta em uma população com característica única e analisa-se sua frequência na população da geração seguinte (LATTA et al., 1998). Se o marcador molecular é altamente polimórfico e especialmente codominante, como no caso dos SSRs, e o número de pais potenciais é relativamente pequeno, o pai de cada semente pode ser identificado de forma precisa.

Os estudos de fluxo gênico e determinação de taxas de fecundação cruzada podem partir de uma população delineada com esse intuito, ou de populações preestabelecidas em bancos de germoplasma, respectivamente. Neste tipo de estudo, os marcadores SSRs (SSR) têm proporcionado resultados seguros nas análises de parentesco.

2.7 Propagação assexuada

Segundo Ovando-Medina et al. (2011), a propagação vegetativa é a mais antiga e mais praticada no pinhão-manso. Apesar de a propagação sexual ser totalmente viável, com a propagação assexuada há precocidade da planta em atingir o estágio produtivo e há padronização das características agronômicas das plantas matrizes previamente selecionadas (KATHIRAVAN;

PONNUSWAMY; VANITHA, 2009). Segundo Matos et al. (2011), atualmente a maioria dos plantios de pinhão manso são oriundos de mudas.

Tal situação se estabeleceu porque a produção de mudas por estaquia é favorável devido à facilidade do pinhão-manso em enraizar por esta via (KATHIRAVAN; PONNUSWAMY; VANITHA, 2009). Segundo a literatura, para a propagação sexual do pinhão-manso, deve-se confeccionar estacas de 22 cm e que tenham origem em estacas colhidas de ramos lenhosos com até 2 anos de idade e localizadas na base dos ramos. Estas devem ser semi-imersas em solo ou substrato úmido, permitindo que 15 cm da estaca permaneça acima do solo. Os primeiros sinais de pegamento ocorrem após 3-4 semanas (ARRUDA et al., 2004; FRANKEN; NIELSEN, 2009; LIMA et al., 2010). Estas estacas podem então ser conduzidas ao campo. Segundo Drummond et al. (1984), para plantios de um hectare utiliza-se espaçamentos 3 x 2 metros.

Atualmente mais trabalhos têm sido conduzidos no intuito de aprimorar a propagação assexuada do pinhão como, por exemplo, pelo trabalho desenvolvido por Evaristo et al. (2011), os quais mensuram a densidade populacional adequada para a produção de mudas de pinhão-manso, percebendo que 50% de ocupação na bancada do viveiro é o mais adequado.

2.8 Bancos de germoplasma

O melhoramento genético do pinhão-manso ainda não é significativo, pois muitas pesquisas básicas ainda necessitam ser realizadas com esta espécie. No entanto, grande avanço científico está sendo obtido com pinhão-manso em localidades da Índia, China, África, América Central, Sul e Norte (Flórida, Hawaii e México), muitas das quais mantêm bancos de germoplasma da espécie.

Na Índia há um banco com 180 genótipos de pinhão-manso no National Botanical Research Institute em Nova Delhi e em Jabalpur na University of

Agriculture. Já na África, o Kenya Agricultural Research Institute (KARI) é o responsável por manter o germoplasma de pinhão-mansão.

Em território mexicano, o Banco Nacional de Germoplasma é mantido pelo Bioscience Center pertencente a Autonomous University of Chiapa em Chiapas e em Chanpingo, pelo Department of Plant Science da University Autonoma of Chanpin, com aproximadamente 100 genótipos de pinhão-mansão.

Há também um banco de germoplasma com genótipos de pinhão-mansão de diversas regiões geográficas do globo, implantado em 2009, mantido pelo Tropical Research and Education Center, Homestead, Flórida, USA.

No Brasil, o mais completo banco de germoplasma de pinhão-mansão é mantido pela Embrapa Agroenergia em parceria com a Embrapa Cerrado em uma área, inclusive experimental, localizada em Planaltina-DF. O banco de germoplasma foi constituído a partir de coletas de sementes de plantas isoladas de pinhão-mansão, entre os meses de dezembro de 2007 e maio de 2008 em diferentes locais, coleções e plantios do Brasil. Os locais de coleta dos genótipos foram fotografados, geo-referenciados e descritos. Visando ampliar a base genética no banco de germoplasma, ainda serão realizadas prospecções em países onde está o provável centro de origem e/ou de diversidade da espécie (LAVIOLA et al., 2011).

Há também bancos de germoplasma regionais de pinhão-mansão como o da Universidade Federal de Sergipe (UFS) em São Cristóvão-SE, da Universidade Federal de Lavras (UFLA) em Lavras-MG, Universidade Federal de Viçosa (UFV) em Viçosa-MG e o da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG) em Nova Porteirinha-MG, sendo este último alvo desta pesquisa e considerado o mais antigo do Brasil, pois está implantado desde a década de 80.

Esses bancos de germoplasma têm importância fundamental em impulsionar as pesquisas de genética e melhoramento do pinhão-mansão.

2.9 Melhoramento aplicado ao pinhão-manso

O método de melhoramento empregado historicamente no pinhão-manso é a seleção. Não de forma proposital, mas despreziosa, devido a sua metodologia de simples avaliação fenotípica de indivíduos superiores, os quais terão as progênes selecionadas para constituírem as futuras gerações. Quando aplicada sem critério, a seleção massal pode levar a perdas de variabilidade genética, problema detectado atualmente no pinhão-manso. A seleção massal continua a ser aplicada ao pinhão-manso, mas com os devidos critérios como controle da fonte de pólen, do efeito de ambiente, tamanho da população e padrões de comparação de pares em função da produção de sementes e de óleo, como executado na seleção massal de pinhão-manso por Mishra (2009).

Como a seleção massal seleciona sempre os fenótipos superiores, isso pode levar à perda de variabilidade e outras metodologias são recomendadas, como a seleção recorrente em pinhão-manso (DIVAKARA et al., 2010). Segundo esses autores, a recombinação genética proporcionada pela seleção recorrente irá aumentar a frequência de genes desejáveis dentro da população, mantendo variabilidade suficiente para continuar a seleção de genótipos de pinhão-manso. Laviola et al. (2010) concordam que a estratégia de melhoramento a ser empregada no pinhão-manso é a seleção recorrente e aconselham como conseguinte a multiplicação sexual dos genótipos selecionados. Para Surwenshi et al. (2011), a seleção recorrente em pinhão-manso é vantajosa por superar as citadas deficiências da seleção massal.

Para que os trabalhos de melhoramento do pinhão-manso sejam bem sucedidos, os programas de melhoramento devem partir de uma população variável. Esta variabilidade não tem sido verificada na espécie e talvez se deva a questões evolucionárias de domesticação e condução da cultura. Para que

variabilidade seja mensurada pode-se lançar mão de ferramentas como citometria de fluxo e marcadores moleculares.

2.10 Citometria de fluxo

Nos últimos anos, a citometria de fluxo tem se consagrado como técnica para a determinação do conteúdo de DNA e, por conseguinte, o nível de ploidia. Tem conquistado espaço na área vegetal pela facilidade com que a técnica oferece informações valiosas sobre inúmeros aspectos relacionados ao genoma, bem como a características celulares (MADAIL, 2011).

A informação gerada pela determinação do conteúdo de DNA, bem como do nível de ploidia, pode ser usada em grande variedade de áreas da ciência e estudos têm apontado esta ferramenta como sendo de grande relevância para a compreensão da biodiversidade do genoma (BENNET; LEITCH, 1997).

A citometria de fluxo é amplamente empregada em espécies vegetais e já contribuiu para as pesquisas com pinhão-manso. Carvalho et al. (2008) aplicaram a citometria de fluxo na determinação do tamanho do genoma de pinhão-manso, identificando que este é relativamente pequeno: 416 Mbp. Os autores determinaram também o conteúdo haploide de DNA indicando o valor $2C$, com 0,85 pg de DNA, composição média de bases de 38,7% de GC e número de cromossomos de $2n= 22$.

Uma aplicação interessante da citometria de fluxo em pinhão-manso foi o estabelecimento da forma de reprodução em trabalho desenvolvido por Ambrosi et al. (2010). Segundo os autores, isso é possível pela determinação do conteúdo de DNA do endosperma e do embrião da semente, pois sementes de reprodução sexuada apresentam embrião ($2C$) combinado com endosperma ($3C$). O EBN (*Endosperme Balance Number*), portanto, é $2m:1p$ (m corresponde ao genoma doado maternalmente e p ao paternalmente). No entanto, se a

semente formada vier de apomixia gametofítica, o conteúdo de DNA do endosperma sofrerá alteração, podendo se apresentar tetraploide (4C) com EBN 4m:0p ou pentaploide (5C) com EBN 4m:1p. Feitas as avaliações, ou autores observaram a não ocorrência de apomixia gametofítica uma vez que os valores 4C e 5C de DNA não foram registrados no endosperma, como eram esperados caso as sementes fossem formadas apomiticamente. Todas as sementes analisadas exibiram embrião diploide com endosperma triploide.

A citometria de fluxo pode descartar a apomixia em pinhão-manso novamente pelo conteúdo de DNA de 0,85 pg, pois o valor C para espécies sexuais é de 1,3 a 3,7 pg enquanto para espécies apomíticas é de 3,1 a 6,0 pg. O tamanho do genoma, portanto, é maior para espécie apomíticas que para espécies sexuais, devido não somente a poliploidização, mas também ao maior conteúdo de DNA por cromossomo (MATZK et al., 2003).

2.11 Marcadores moleculares aplicados ao pinhão-manso

As metodologias de avaliação genética baseadas em caracteres morfológicos são úteis para estabelecer as relações filogenéticas no gênero *Jatropha*, mas são insuficientes para definir as relações e a diversidade genética dentro da espécie *J. curcas*, ou seja, entre seus genótipos (OVANDO-MEDINA et al., 2011). Isso ocorre devido às fortes influências ambientais sobre as características fenotípicas avaliadas como peso de sementes, conteúdo de óleo, de proteína, etc. (HELLER, 1991, 1996; SAKAGUCHI; SOMABHI, 1987; SUKARIN; YAMADA; SAKAGUCHI, 1987). Portanto, avaliações de variação genética são mais viáveis utilizando-se de marcadores moleculares que não sofrem interferência ambiental (BASHA; SUJATHA, 2007).

Diversos marcadores baseados no DNA estão sendo usados para estudar o germoplasma de *J. curcas* pelo mundo. Ovando-Medina et al. (2011) fizeram

um levantamento sobre esse assunto e relatam que os marcadores moleculares são aplicados a dois tipos de estudos no pinhão-manso. Primeiramente para investigação das relações filogenéticas no gênero *Jatropha*, e também no estudo da variabilidade genética em genótipos de pinhão-manso de diferentes origens para auxiliar programas de melhoramento genético assistidos por marcadores.

2.11.1 SSR (*Simple Sequence Repeats*) ou microssatélite

Um grupo de marcadores amplamente aconselhado são os SSRs ou marcadores microssatélite. Os SSRs são sequências de nucleotídeos constituídas pela repetição ininterrupta de um único padrão de nucleotídeos, com máximo de 6 pb (CABRAL, 2008). Tratam-se de sequências simples de DNA, encontradas em maior ou menor grau nos genomas de organismos e organelas (mitocôndrias e proplastídeos) (CHAMBERS; MACAVOY, 2000; CIPRIANI et al., 2008). Segundo Gupta e Varshney (2000), são marcadores amplamente utilizados por serem altamente reprodutíveis, polimórficos e codominantes, permitindo a visualização de ambos os alelos de um indivíduo heterozigoto. Esses marcadores moleculares podem fornecer muita informação e permitem detectar os diferentes graus de polimorfismo (SCHLÖTTERER, 2004). Os SSRs são abundantes em plantas e os alelos SSRs e seus diferentes produtos amplificados podem ser confiavelmente separados (SANTOS et al., 2010).

Sun et al. (2008) utilizaram-se de 17 marcadores SSRs, mas não foi possível separar os oito genótipos de pinhão-manso chineses avaliados. Basha et al. (2009) verificaram que apenas genótipos de pinhão-manso provenientes do México e de El Salvador apresentaram variação genética após serem avaliados com 12 marcadores SSRs, enquanto que genótipos provenientes de outros países produziram padrões genéticos idênticos. Semelhantemente, Phumichai et al. (2011) detectaram baixa variabilidade genética entre 26 genótipos de pinhão-

manso da Tailândia, sendo que estes pesquisadores testaram 55 marcadores SSRs e somente 11 foram polimórficos. Os marcadores SSRs também foram testados por Na-Ek et al. (2011) para investigar a diversidade genética entre 32 genótipos de pinhão-manso da Tailândia, a qual foi considerada baixa (0,16). Pamidimarri et al. (2011) testaram 40 SSRs isolados da espécie *J. curcas* e os testaram também em outras espécies de *Jatropha*, identificando somente 38% de polimorfismo, o que é baixo considerando a variabilidade entre espécies. Em trabalho conduzido por Whankaew et al. (2011), foi avaliada a transferência de SSRs entre espécies da família *Euphorbiaceae*. Foram testados 290 SSRs, os quais tiveram uma transferência de 59,18% entre mandioca e seringueira, mas, do total, somente 42 amplificaram no pinhão-manso. Sharma et al. (2011) também mediram a transferibilidade de SSRs, mas somente entre mamona e pinhão-manso. Assim, 302 SSRs foram testados e 211 amplificaram em 46 genótipos de pinhão-manso, demonstrando alta taxa de transferência.

2.11.2 ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*)

Outro marcador a ser explorado é o ISSR. Diversos trabalhos apresentam alto conteúdo de informação genética desvendado por estes marcadores, que aparentemente são apropriados para estudos filogenéticos, de avaliação da diversidade genética e identificação de cultivares (ALMEIDA et al., 2009). De acordo com Wang et al. (2009), os marcadores ISSR estão presentes nos genomas do núcleo e das organelas celulares (mitocôndrias), e geralmente são altamente polimórficos em populações de plantas, proporcionando uma genotipagem consistente e confiável.

Em trabalho conduzido por Basha e Sujatha (2007), o ISSR foi um dos marcadores utilizados. Foram testados 42 genótipos de pinhão-manso da Índia e 33,5% de polimorfismo foi detectado por intermédio desta ferramenta,

considerado pelos autores um modesto nível de variação genética. Os mesmos autores Basha e Sujatha (2009) aplicaram, dentre outros marcadores, o ISSR à distinção entre híbridos interespecíficos de *Jatropha*.

No trabalho de Kumar et al. (2011), este foi um dos marcadores empregados. Os autores avaliaram a diversidade genética em germoplasma de pinhão-mansão coletado no norte da Índia, a qual foi mais expressiva entre os genótipos coletados nas cidades de Assam e Meghalaya. Chen et al. (2011) se utilizaram tanto de ISSR quanto de RAPD para determinar as relações genéticas entre clones de pinhão-mansão de distintas regiões da China. Foram identificados 34% de polimorfismo entre os clones, os quais foram separados em dois grupos, pois o clone originário de Yuan Mou ficou isolado em um único grupo. Por outro lado, Grativol et al. (2011) avaliaram a diversidade genética em 332 genótipos de pinhão-mansão de oito estados brasileiros. Os autores utilizaram sete marcadores ISSR e observaram que os genótipos avaliados possuem estreita relação genética entre si, mas possuem maior nível de diversidade genética que genótipos de outros países. Entre os estados brasileiros, os genótipos originados de Natal (RN) foram os mais diversos e os autores recomendam os genótipos dessa região como fonte de diversidade genética para os programas de melhoramento da espécie.

Tanya et al. (2011) conseguiram amplificar 27 marcadores ISSR de um total de 86, para verificar as relações genéticas entre 30 genótipos de *J. curcas*, 2 genótipos *J. gossypifolia*, 2 genótipos *J. integerrima*, 2 genótipos *J. podagrica* e 3 genótipos híbridos de *Ricinus communis*. As plantas foram separadas em sete grupos, o primeiro contendo somente pinhão-mansão do México, o segundo compreendendo pinhão-mansão da China e do Vietnã, o terceiro compunha pinhão-mansão da Tailândia, o quarto grupo distinguiu a *J. integerrima*, o quinto grupo foi a *J. gossypifolia*, o sexto grupo a *J. podagrica* e o sétimo grupo distinguiu a *R. communis*.

Segundo Maghuly et al. (2011), uma coleção *in vitro* de 1.300 genótipos de pinhão-manso advindos de 12 países foram avaliadas com 50 iniciadores ISSR. Os autores afirmam que os dados mostraram nítidas variações não apenas entre os indivíduos, mas também entre diferentes regiões.

Camellia, Thohirah e Abdullah (2012) também se utilizaram de marcadores ISSR para mensurar a relação genética entre 16 genótipos de pinhão-manso da coleção da Malásia. Os autores observaram estreita relação genética entre os genótipos concluindo que a introdução de pinhão-manso na Malásia adveio de mesma origem.

A informação mais comum na literatura, tanto de marcadores SSR, ISSR quanto outros marcadores aqui não citados, é a baixa variabilidade genética do pinhão-manso, exceto nas plantas provenientes da Mesoamérica.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material vegetal

Os genótipos de pinhão-manso utilizados na pesquisa foram oriundos do Banco de Germoplasma de pinhão-manso, mantido na EPAMIG de Nova Porteirinha, localizado no norte do estado de Minas Gerais.

3.1.1 Caracterização genômica do germoplasma norte mineiro de pinhão-manso.

Por ocasião da coleta do material vegetal, a maioria dos genótipos continham somente folhas, as quais foram liofilizadas e armazenadas para avaliação molecular. Somente as plantas que possuíam sementes foram germinadas na EPAMIG de Caldas e constituíram nos 10 genótipos disponíveis para avaliação por citometria de fluxo.

Sendo assim, foram avaliadas 20 plantas de 10 genótipos de pinhão-manso, das quais foi coletado um disco foliar por planta (Tabela 1).

Tabela 1 Descrição dos 10 genótipos de pinhão-manso avaliados por citometria de fluxo, com o respectivo número da amostra e a referida identificação mantida a campo
Fonte: EPAMIG, Nova Porteirinha, MG (2011)*

Identificação	Genótipo	Identificação	Genótipo
2	BAG-JC-37	21	BAG-JC-24
3	BAG-JC-38	27	BAG-JC-30
8	BAG-JC-45	33	BAG-JC-06
16	BAG-JC-18	40	BAG-JC-48
18	BAG-JC-21	42	BAG-JC-72 (mexicano)

*Cada genótipo foi constituído por 20 plantas

3.1.2 Diversidade genética no germoplasma norte mineiro de pinhão-manso

Este experimento foi conduzido com 48 genótipos do gênero *Jatropha*, sendo 46 *J. curcas*, um *J. podagriga* e um *J. molissima* (Tabela 2).

Tabela 2 Genótipos de *Jatropha* com o respectivo número da amostra e a referida identificação mantida a campo
Fonte: EPAMIG, Nova Porteirinha, MG (2011)

Identificação	Genótipo	Identificação	Genótipo
1	BAG-JC-36	25	BAG-JC-28
2	BAG-JC-37	26	BAG-JC-29
3	BAG-JC-38	27	BAG-JC-30
4	BAG-JC-41	28	BAG-JC-01
5	BAG-JC-42	29	BAG-JC-02
6	BAG-JC-43	30	BAG-JC-03
7	BAG-JC-44	31	BAG-JC-04
8	BAG-JC-45	32	BAG-JC-05
9	BAG-JC-46	33	BAG-JC-06
10	BAG-JC-47	34	BAG-JC-07
11	BAG-JC-31	35	BAG-JC-08
12	BAG-JC-32	36	BAG-JC-09
13	BAG-JC-33	37	BAG-JC-12
14	BAG-JC-16	38	BAG-JC-13
15	BAG-JC-17	39	BAG-JC-15
16	BAG-JC-18	40	BAG-JC-48
17	BAG-JC-19	41	BAG-JC-71
28	BAG-JC-21	42	BAG-JC-72 _A (mexicano)
19	BAG-JC-22	43	BAG-JC-72 _B (mexicano)
20	BAG-JC-23	44	BAG-JC-71 (mexicano)
21	BAG-JC-24	45	BAG-JC-84 (mexicano)
22	BAG-JC-25	46	<i>J. curcas</i> (anã)
23	BAG-JC-26	47	<i>J. podagriga</i> (ornamental)
24	BAG-JC-27	48	<i>J. molissima</i> (pinhão-bravo)

3.1.3 Teste de diversidade entre progênies do germoplasma norte mineiro de pinhão-mansão

O terceiro experimento diz respeito à diversidade observada entre meios-irmãos, por meio da estimação da taxa de fecundação cruzada que ocorre

naturalmente entre os genótipos. Utilizou-se 10 genótipos maternos de pinhão-manso com 20 indivíduos, constituindo dois *bulks* de 10 indivíduos por progênie de pinhão-manso (Tabela 3).

Tabela 3 Genótipos de *Jatropha* com a referida identificação mantida a campo e as respectivas identificações das amostras maternas (M) e filiais (*Bulk*)
Fonte: EPAMIG, Nova Porteirinha, MG (2011)*

Genótipo	Identificação maternal	Identificação filial	
		<i>Bulk</i> 1	<i>Bulk</i> 2
BAG-JC-37	M2	2.1	2.2
BAG-JC-38	M3	3.1	3.2
BAG-JC-45	M8	8.1	8.2
BAG-JC-18	M16	16.1	16.2
BAG-JC-21	M18	18.1	18.1
BAG-JC-24	M21	21.1	21.1
BAG-JC-30	M27	27.1	27.2
BAG-JC-06	M33	33.1	33.2
BAG-JC-48	M40	40.1	40.2
BAG-JC-72 (mexicano)	M42	42.1	42.2

* Para cada grupo de progênies foi preparado dois *Bulks* com 10 plantas.

A amostra de cada genótipo maternal foi retirada de uma única planta adulta, mantida a campo e as amostras das progênies foram retiradas de folhas dos seedlings com cerca de seis meses, mantidos em viveiro telado.

3.2 Citometria de fluxo

O preparo das amostras e as análises por citometria de fluxo foram realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais/Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras. As amostras vegetais usadas para quantificar o DNA em citômetro de fluxo foram folhas os mais jovens possíveis. Foi coletada uma folha de cada planta e retirada uma pequena porção

na região mediana. Os fragmentos foram embalados em sacos plásticos juntamente com algodão umedecido, identificados e levados para o laboratório.

Foram utilizados aproximadamente 50-60mg de folhas frescas de cada planta analisada, juntamente com uma amostra correspondente do padrão interno, neste caso, a ervilha (*Pisum sativum* – 9,09 pg de DNA). Esse material foi triturado com auxílio de um bisturi, em placa de petri, contendo 1mL de tampão LB01 gelado para a liberação de núcleos. A suspensão de núcleos foi aspirada através de duas camadas de gaze com o auxílio de pipeta plástica e então filtrada em filtros de malha de 50µm. Essa suspensão foi mantida em um recipiente com gelo para que não houvesse deterioração dos núcleos. Em seguida foram adicionados à suspensão 25µL do fluorocromo iodeto de propídeo.

Foram avaliadas três amostras para cada genótipo avaliado, sendo cada uma delas considerada uma repetição, o delineamento utilizado foi inteiramente casualizado com três repetições. Foram analisados 10 mil núcleos no citômetro FacsCalibur (BD, Biosciences, San Jose, CA, USA),

3.3 Extração de DNA

Para a extração do DNA genômico foram utilizadas folhas jovens coletadas de plantas adultas mantidas no campo. As folhas retiradas foram colocadas em envelope de papel alumínio devidamente identificado com o nome do genótipo e a data da coleta. Para o transporte das amostras até o laboratório, os envelopes foram guardados em sacos plásticos e acondicionados em caixas de isopor contendo gelo.

No laboratório, as amostras foram armazenadas a -80 °C até o momento da extração do DNA. A extração de DNA foi realizada de acordo com a metodologia de Nunes et al. (2011), descrita a seguir. De cada amostra foram

utilizados, aproximadamente, 0,5 g de tecido foliar que foram macerados na presença de nitrogênio líquido. Em seguida, foram adicionados 1 mL de tampão de extração [Tris-HCl 100 mM, EDTA 50 mM, CTAB 2% (p/v), PVP 0,1% (p/v), mercaptoetanol 0,2% (v/v)], os extratos foram transferidos para tubos de polipropileno de 2 mL e incubados a 65 °C durante 1 hora em banho-maria, com constante agitação. Passado este tempo, foram adicionados 400 µL de clorofórmio:álcool isoamílico na proporção de 24:1 e agitados por inversão durante 5 minutos. Em seguida, o extrato foi centrifugado a 13.000 rpm durante 10 minutos e a fase aquosa do sobrenadante foi transferida para um novo tubo. Foram adicionados 400 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), agitados por inversão durante 5 minutos e novamente centrifugados a 13.000 rpm durante 15 minutos. O sobrenadante foi coletado e transferido para novos tubos e adicionado 1 mL de isopropanol gelado e 100 µL de acetato de amônia (7,5 M) e novamente foram levemente agitados. As amostras foram incubadas a -20 °C “overnight” e em seguida centrifugadas a 13.000 rpm durante 30 minutos para a formação dos “pellets” de DNA, que foram então lavados 3 vezes com etanol 70%, secos a temperatura ambiente e logo em seguida, ressuspensos em 200 µL de TE [Tris-HCl 10 mM (pH 8,0), EDTA 1mM]. Finalmente as amostras foram tratadas com RNase-A e incubadas a 37 °C por 1 hora.

As amostras de DNA foram visualizadas na presença de luz UV após eletroforese em gel de agarose 0,7% corado com brometo de etídeo (0,3 µg/mL) e imerso em tampão TBE [Tris-Borato 90 mM (pH 8,0) EDTA 10 mM] para verificar a qualidade do DNA. A quantificação do DNA foi realizada através da leitura das absorbâncias em espectrofotômetro no comprimento de onda de 260 nm. Para verificar a contaminação das amostras com proteínas foi realizada leitura das absorbâncias a 280 nm e calculada a relação entre as absorbâncias a 260 e 280 nm. Foram consideradas adequadas amostras cuja relação variou de 1,5 a 2.

3.4 Análises com marcadores moleculares

3.4.1 SSR

Para a realização do presente trabalho, utilizou-se 8 iniciadores previamente indicados na literatura como polimórficos para a espécie *Jatropha curcas* L: Jcps9, Jcps21, Jcds58, Jcds66, Jcps10, Jcps24, Jcds41 e Jct27 (Tabela 4) (ACHTEN et al., 2010; PAMIDIMARRI et al., 2009; PHUMICHAJ et al., 2011).

Tabela 4 Número de identificação (NI), nome dos iniciadores SSR, suas sequências, temperatura de anelamento (Ta), tamanho esperado dos alelos (pares de base - NCBI) e a respectiva referência bibliográfica (Ref.) dos iniciadores SSRs de *J.curcas*
Fonte: EPAMIG, Caldas, MG (2011) (dados gerados pela autora)*

NI	Inic.	Sequência	Ta (°C)	Tamanho do alelo	Ref.
1	Jcps9	D:GTACTTAGATCTCTTGTAACAAACAG R:TATCTCTTGTTTCAGAAATGGAT	48,0	252	Achten et al. (2010)
3	Jcps21	D:CCTGCTGACAGGCCATGATT R:TTTCACTGCAGAGGTAGCTTGATA	54,8	248	Achten et al. (2010)
6	Jcds58	D:TCCATGAAGTTTGCTGGCAAT R:AGGTCATCTGGTAAAGCCATAACC	54,0	129	Achten et al. (2010)
8	Jcds66	D:CCTACGAGTGATTGGATAGTTTCTCA R:TCTTCCATCAAGAGTCGTTGGGCA	54,0	218	Achten et al. (2010)
12	Jcps10	D:CATCAAATGCTAATGAAAGTACA R:CACACCTAGCAAACACTACTTGCA	46,5	148	Pamidimarri et al. (2009)
13	Jcps24	D:GGATATGAAGTTTCATGGGACAAG R:TTCATTGAATGGATGGTTGTAAGG	51,0	222	Pamidimarri et al. (2009)
14	Jcps41	D:AACACACCATGGGCCACAGGT R:TGCATGTGTGCGGGTTTGATTAC	56,6	133	Pamidimarri et al. (2009)
24	Jct27	D:GCCATTAGAATGGACGGCTA R:TGCGTGAAGCTTGATTTGA	60,0	328	Phumichai et al. (2011)

*D – direto, R – reverso.

As reações de amplificação foram realizadas em um volume final de 25 µL, contendo 50 ng de DNA, 6 µL de tampão de reação 5X, 1,5mM de MgCl₂,

200 μM de cada DNTPs, 0,2 μM de cada iniciador (Sigma, USA) e 2U de Taq DNA polimerase (Go Taq Flexi, Promega, USA).

As reações foram conduzidas em termociclador com gradiente (Multigene Gradient, Labnet International, USA) utilizando um programa Touchdown, o qual decresceu a temperatura de anelamento dos iniciadores de 62 °C a 54 °C. O programa completo consistiu de desnaturação inicial a 94°C por 5 min, 8 ciclos de: desnaturação a 94°C por 50 segundos, anelamento a 62°C por 45 seg e extensão 72 °C por 1 min. Seguidos por 33 ciclos de: desnaturação a 94°C por 50 seg, anelamento a 54 °C por 45 seg e extensão a 72 °C por 1min. A extensão final ocorreu a 72 °C por 10 min.

Para confirmar a qualidade final dos produtos das reações de amplificação, alíquotas de 2 μL das amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 0,7% imerso em tampão TBE [Tris-Borato 90 mM (pH 8,0) EDTA 10 mM] e corado com brometo de etídeo (0,3 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e visualizadas em luz UV.

Uma vez confirmado o sucesso das reações de amplificação em géis de agarose a 0,7%, o produto da reação foi submetido a eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida 6%, a potência de 60W por tempo variável de acordo com o tamanho esperado dos alelos.

Após a corrida, os géis foram corados com nitrato de prata de acordo com o método descrito por Creste, Tulmann-Neto e Figueira (2001). Inicialmente o gel em processo de coloração passou por uma etapa de fixação durante 10 minutos em solução de etanol (10%) e ácido acético (1%). Em seguida foi lavado com 2 L de água ultra-pura (Milli-Q) e submetido a uma pré-coloração com ácido nítrico 1,5%. Passou então por nova lavagem e foi corado em solução de nitrato de prata (0,2%) durante 20 minutos. A revelação foi realizada com solução de carbonato de sódio (3,5%) contendo 800 μL de formaldeído 37% (adicionado pouco antes da revelação) durante 20 minutos.

Finalmente o gel foi imerso em solução de parada composta de ácido acético (1,5%) durante 5 minutos. Todas as etapas foram realizadas sobre mesa agitadora e em capela de exaustão. Depois de secar “overnight” à temperatura ambiente, o gel foi fotografado sobre negatoscópio.

3.4.2 ISSR

Foram utilizados 5 iniciadores ISSR previamente indicados na literatura como polimórficos (ARNAU; LALLEMAND; BOURGOIN, 2002), descritos na Tabela 5.

Tabela 5 Relação dos iniciadores ISSR utilizados na avaliação dos 48 genótipos de *Jatropha*, com as respectivas sequências e temperatura de anelamento (Ta)
Fonte: EPAMIG, Caldas, MG (2011) (dados gerados pela autora)*

Iniciador	Sequência	Ta
VBV (AC)7	5'VBVACACACACACACAC3'	51°C
BDB (CA)7	5'BDBCACACACACACACA3'	51°C
HBH (CT)7	5'HBHCTCTCTCTCTCT3'	47°C
GCV (TC)7	5'GCVTCTCTCTCTCTC3'	49°C
BDV (AG)7	5'BDVAGAGAGAGAGAG3'	47°C

*Onde lê-se: V (todas as bases estão em concentração equimolar exceto T); B (todas as bases estão em concentração equimolar exceto A); H (todas as bases estão em concentração equimolar exceto G) e D (todas as bases estão em concentração equimolar exceto C)

As reações de amplificação para os ISSR foram realizadas em volume final de 25 µl, contendo: 50 ng de DNA, 7,5 µl de tampão de reação 5X, 1,5 mM de MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, 0,8 µM do iniciador (Sigma, USA) e 2,4U de Taq DNA polimerase (Go Taq Flexi, Promega, USA). As reações foram conduzidas em termociclador com gradiente (Multigene Gradient, Labnet International, USA) programado para um passo inicial de desnaturação de 2 minutos a 95°C seguido de 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 45 segundos. A temperatura de anelamento dos iniciadores foi definida em função de cada

iniciador: VBV (AC)7 - 51°C, BDB (CA)7- 51°C, HBH (CT)7- 47°C, GCV (TC)7- 49°C, BDV- 47°C. Ambos os anelamentos ocorreram por 1min e a extensão dos iniciadores a 72°C por 2 minutos. Foi realizado um passo de extensão final a 72°C por 5 minutos. Foram realizadas duas ampliações independentes para cada iniciador, a fim de se atestar a reprodutibilidade e confiança dos dados. Somente bandas reprodutíveis de duas ampliações independentes foram avaliadas, devido à inespecificidade de algumas bandas geradas (ARNAU; LALLEMAND; BOURGOIN, 2002).

Os produtos de amplificação (5 µL das amostras) foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5% corados com brometo de etídeo (0,3 µg/mL), imerso em tampão TBE [Tris-Borato 90 mM (pH 8,0) EDTA 10mM] por 4 h sob tensão de 110 V, os quais foram posteriormente fotodocumentados sob luz UV.

3.5 Análises dos dados

Os histogramas da citometria de fluxo foram obtidos com o software Cell Quest e analisados estatisticamente no software WinMDI 2.8. O conteúdo de DNA nuclear (pg) das plantas foi estimado por comparação com a posição em relação ao pico G1 do padrão interno de referência (*Pisum sativum*). Os resultados foram submetidos à análise de variância e as médias agrupadas pelo teste de Scot-Knott a 5% de significância.

A partir dos perfis alélicos gerados com os 8 marcadores SSRs para os 48 genótipos de *Jatropha*, foi construída uma matriz, na qual cada alelo de cada loco foi designado numericamente de 1 até o número máximo de alelos por loco. Para os perfis alélicos gerados pelos 5 iniciadores ISSR, os dados foram plotados em matriz binária onde: 0 – ausência de banda, 1 – presença de banda e -1 – dados perdidos. Foi estruturada a árvore fenética pelo método UPGMA,

obtida pelo índice CS Chord 1967 para SSR e distância Shared allele para ISSR, obtidos utilizando o programa "Powermarker Version 3.25" (LIU; MUSE, 2005).

Foram realizadas correlações entre os marcadores moleculares SSR e ISSR, foram feitas utilizando o teste de Mantel (1967), que consiste na comparação das matrizes de distâncias (GD), por meio do software GenAlex version 6.41 (PEAKALL; SMOUSE, 2006). Os valores de bootstrap foram obtidos com auxílio do aplicativo "dBood" (COELHO, 2001), sendo que as porcentagens de cada agrupamento foram obtidas após análise com 10.000 "bootstraps".

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização genômica do germoplasma norte mineiro de pinhão-manso

Na figura 1 é apresentado o histograma de distribuição de fluorescência que geram dois picos representando a fase G1 tanto de pinhão-manso quanto de ervilha. O conteúdo de DNA foi calculado em função da razão entre os dois picos gerados.

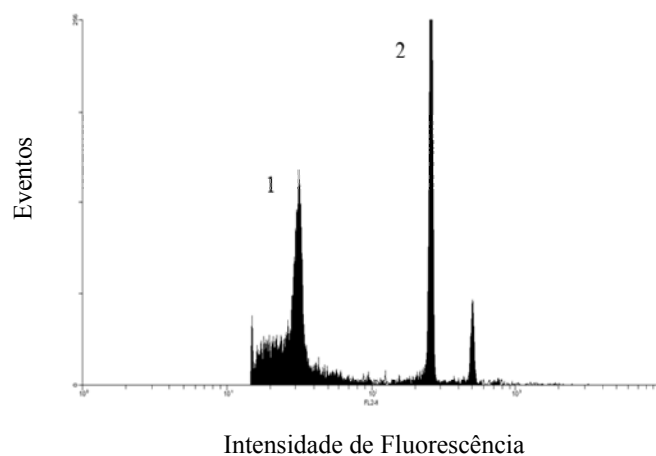


Figura 1 Histograma de citometria de fluxo obtido com o tampão de extração LB01. O primeiro pico G1 representa o genótipo BAG-JC-37 de pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) e o segundo pico é o da ervilha (*Pisum sativum* L.)
Fonte: UFLA, Lavras, MG (2011) (elaborado pela autora)

O conteúdo de DNA dos 10 genótipos de pinhão-manso avaliados está descrito na Tabela 6.

Tabela 6 Conteúdo de DNA estimado por citometria de fluxo para os 10 genótipos da coleção norte mineira de pinhão-manso.
Fonte: UFLA, Lavras, MG (2011)

Identificação laboratorial	Genótipo	CV (%)	Conteúdo de DNA (pg)
2	BAG-JC-37	1,40	1,04 a
3	BAG-JC-38	1,43	1,00 a
8	BAG-JC-45	1,42	1,11 a
16	BAG-JC-18	2,66	1,06 a
18	BAG-JC-21	1,48	1,02 a
21	BAG-JC-24	1,49	0,98 a
27	BAG-JC-30	1,48	1,03 a
33	BAG-JC-06	1,48	1,07 a
40	BAG-JC-48	1,67	1,03 a
42	BAG-JC-72 (mexicano)	1,18	1,11 a

Médias seguidas pela mesma letra dentro da coluna pertencem ao mesmo grupo, segundo o Teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade

Em média observou-se 1,04 pg de DNA, enquanto Carvalho et al. (2008) observaram em média 0,85 pg de DNA para a mesma espécie. Esta diferença deve-se provavelmente à diferença de padrão de comparação interno utilizado, pois ao invés de *Pisum sativum* (9,09 pg), os autores utilizaram *Raphanus sativa* (1,11 pg), a qual possui conteúdo de DNA mais próximo de *Jatropha curcas*. Entretanto, pode-se observar que não houve diferença na variável conteúdo de DNA entre os diferentes genótipos de pinhão-manso avaliados, significando igualdade no tamanho do genoma.

Por revisão da literatura, pode-se observar que o emprego desta ferramenta com o intuito de mensurar diferenças no genoma é mais eficiente a

nível interespecífico ou quando há ocorrência de aneuploidias e poliploidias. Variabilidades foram observadas entre os gêneros de *Milium* (BENNETT; BENNETT, 1992), *Dasypyrum* (CACERES et al., 1998) e *Dactylis* (REEVES et al., 1998). Mais recentemente, Oliveira (2011) se utilizou de citometria para avaliar o conteúdo de DNA de diversas frutíferas, conseguindo estruturar eficientemente as espécies de figueira (*Ficus carica* L.) em dois grupos e de pessegueiro [*Prunus persica* (L.) Batsch] em quatro grupos.

O presente trabalho avaliou somente progênies dos genótipos de *J. curcas*, ou seja, variabilidade intraespecífica. Esta teria que ser muito elevada para possibilitar sua detecção. De forma semelhante, igualdade genômica foi verificada por Tensch e Greilhuber (2000), ao estudarem amendoim (*Arachis hypogaea*). Os autores encontraram uniformidade do tamanho do genoma na espécie e sugerem a associação deste fato à baixa variabilidade molecular da espécie.

Diante disso, aplicou-se ferramentas mais apuradas na caracterização molecular da coleção norte mineira de pinhão-manso.

4.2 Diversidade genética no germoplasma norte mineiro de pinhão-manso

4.2.1 SSR

Por ocasião do início dos trabalhos com marcadores SSRs, a literatura mais recente foi acessada, na busca da disponibilidade e recomendação destes marcadores para a cultura do pinhão-manso. Sendo assim, 30 marcadores foram selecionados, no entanto somente oito amplificaram nas amostras em avaliação. Essa ocorrência se deve ao fato de ser a espécie recente na comunidade científica e, portanto, as informações disponíveis estarem em processo de validação.

O conjunto dos oito marcadores SSR avaliados detectaram reduzida variabilidade genética nos genótipos de *J. curcas*. No entanto, as espécies *J. podagrica* (genótipo 47) e *J. molissima* (genótipo 48), apresentaram perfis distintos, sendo a primeira espécie menos divergente dos genótipos de *J. curcas* (Figura 2).

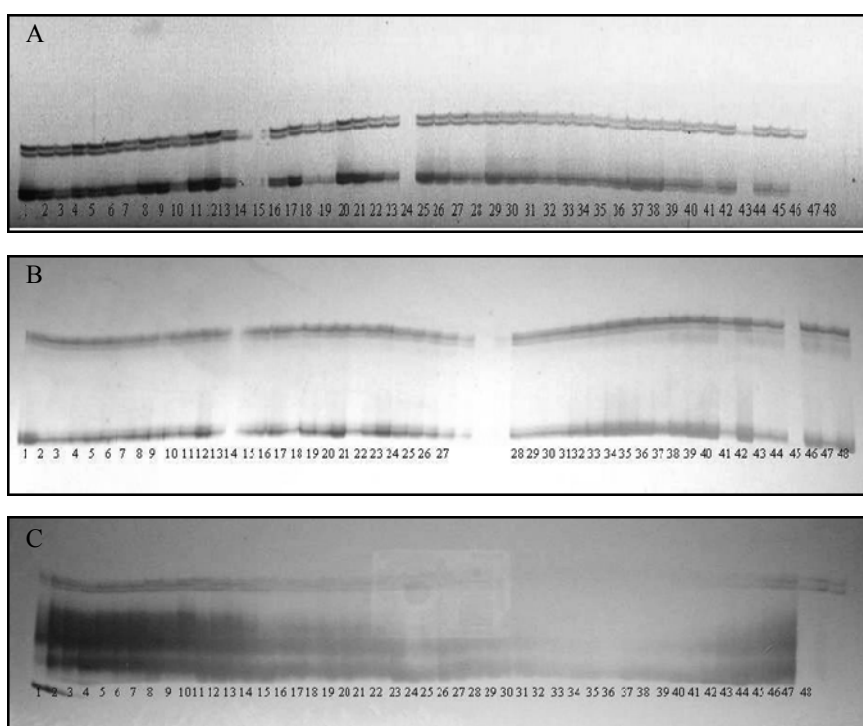


Figura 2 Imagens dos geis desnaturantes de poliacrilamida mostrando o padrão de bandas geradas por SSRs para os 48 genótipos de *Jatropha* avaliados. A) Marcador Jcps9; B) Marcador Jcps21; C) Marcador Jcjs58; D) Marcador Jcjs66; E) Marcador Jcps10; F) Marcador Jcps24; G) Marcador Jcps41; H) Marcador Jct27 “Continua”
 Fonte: EPAMIG, Caldas, MG (2011) (imagens geradas pela autora)

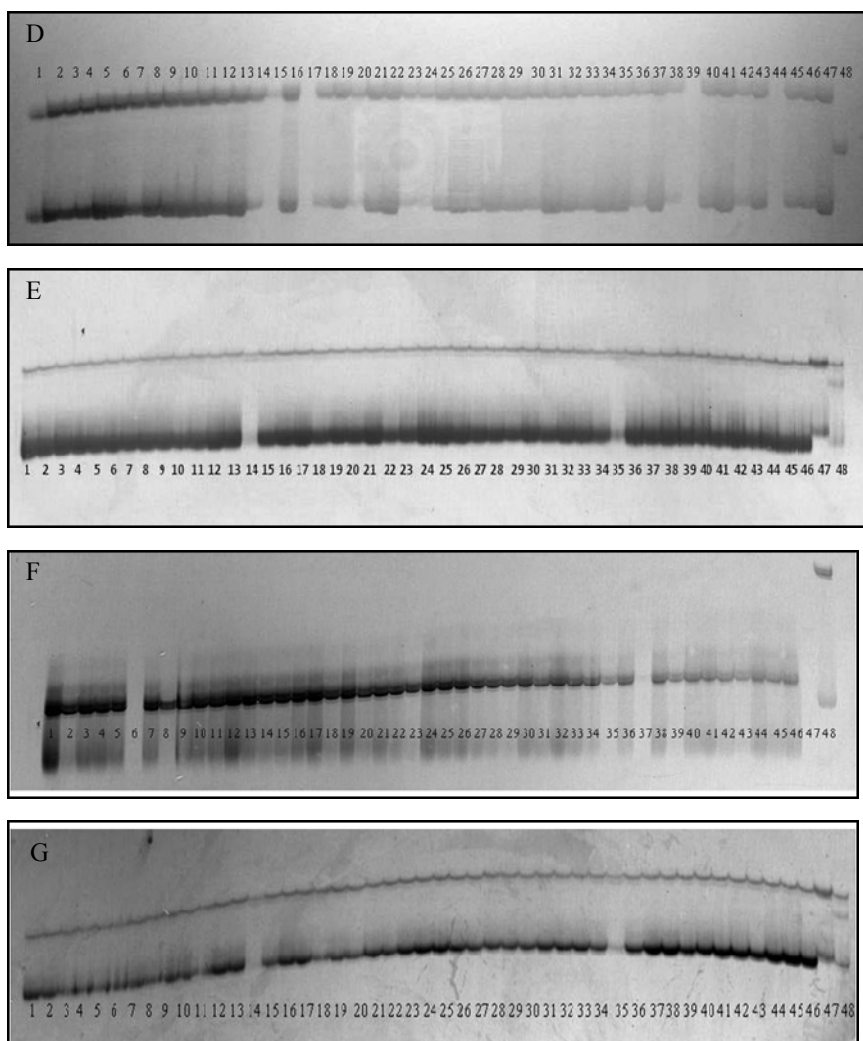


Figura 2 Imagens dos geis desnaturantes de poliacrilamida mostrando o padrão de bandas geradas por SSRs para os 48 genótipos de *Jatropha* avaliados. A) Marcador Jcps9; B) Marcador Jcps21; C) Marcador Jcds58; D) Marcador Jcds66; E) Marcador Jcps10; F) Marcador Jcps24; G) Marcador Jcps41; H) Marcador Jct27 “Continua”
 Fonte: EPAMIG, Caldas, MG (2011) (imagens geradas pela autora)

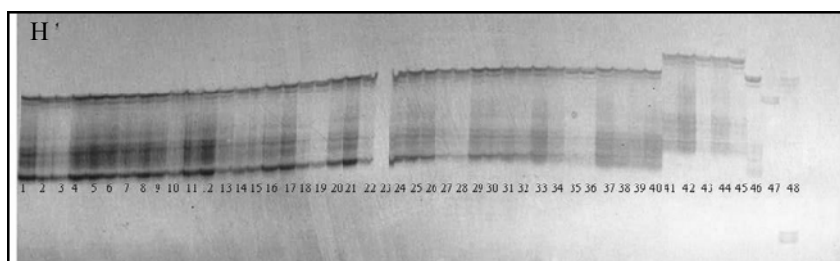


Figura 2 Imagens dos geis desnaturantes de poliacrilamida mostrando o padrão de bandas geradas por SSRs para os 48 genótipos de *Jatropha* avaliados. A) Marcador Jcps9; B) Marcador Jcps21; C) Marcador Jcds58; D) Marcador Jcds66; E) Marcador Jcps10; F) Marcador Jcps24; G) Marcador Jcps41; H) Marcador Jct27
Fonte: EPAMIG, Caldas, MG (2011) (imagens geradas pela autora)

Considerando ainda o conjunto dos oito marcadores SSR, foi possível obter a árvore fenética entre os indivíduos (Figura 3). Observa-se que quatro grupo foram formados e o grupo mais distante conteve o genótipo 48 (pinhão-bravo). Este fato é esperado já que esse genótipo representa outra espécie, ou seja, *J. molissima*, que fez parte da análise por se caracterizar como *outgroup*. O segundo grupo mais distante geneticamente agregou o genótipo 47 (pinhão-ornamental), representado pela *J. podagrica*, o terceiro agrupou os genótipos 42, 43, 44 e 45 (BAG-JC-72_A, BAG-JC-72_B, BAG-JC-71 e BAG-JC-84) de pinhão-manso mexicanos e o genótipo 41 (BAG-JC-71) de pinhão-manso nacional, enquanto o quarto e maior grupo englobou todos os demais genótipos de pinhão-manso nacionais.

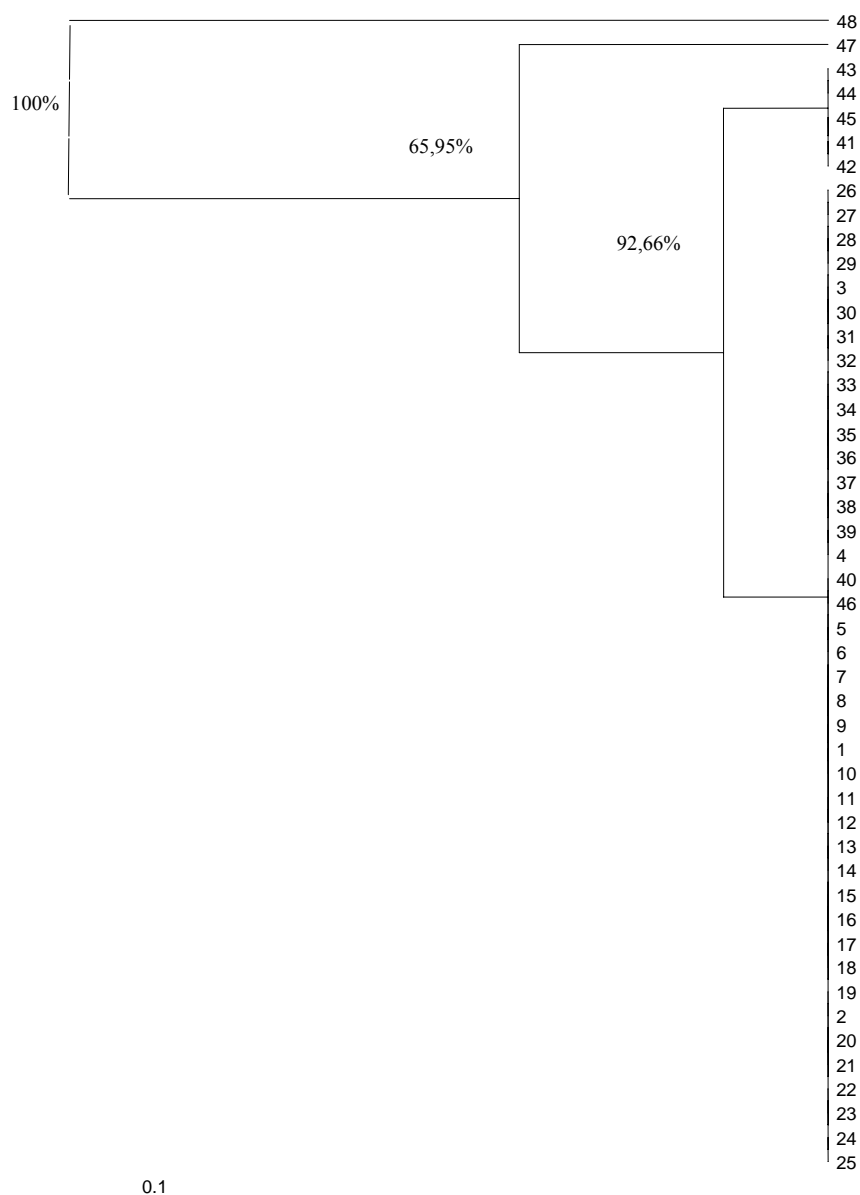


Figura 3 Árvore fenética UPGMA, obtida para SSR pelo índice CS Chord 1967, demonstrando as relações genéticas entre os 48 genótipos de *Jatropha* analisados, sendo 46 genótipos de *J. curcas*, um genótipo de *J. podagrica* e um genótipo *J. molissima*.

Fonte: EPAMIG, Caldas, MG (2011) (elaborado pela autora)

Na tabela 7 têm-se alguns parâmetros genéticos deduzidos a partir dos resultados dos iniciadores SSR. No presente trabalho o número de alelos variou de 2 a 5, dado que está em consenso com a literatura. Esses valores são relativamente semelhantes aos encontrados em demais trabalhos de mesma natureza. Sharma e Chauhan (2011) observaram de 2 a 6 alelos ao transferirem iniciadores SSR da mamona ao pinhão-manso. Já Na-Ek et al. (2011) observaram de 2 a 4 alelos por loco, enquanto Bressan et al. (2012) observaram de 2 a 8 alelos por loco ao desenvolverem novos marcadores SSR para o pinhão-manso. Como se pode observar, é baixo o número de alelos que se identifica por loco no pinhão-manso e isso é reflexo de sua reduzida variabilidade genética.

Tabela 7 Parâmetros genéticos para os 8 iniciadores microssatélites utilizados na identificação e caracterização dos 48 genótipos de *Jatropha*. Onde: He: heterozigosidade esperada; Ho: heterozigosidade observada e PIC: conteúdo de informação polimórfica
Fonte: EPAMIG, Caldas, MG (2011)

Nº identificação	Iniciador	Nº de alelos	He	Ho	PIC
1	Jcps9	2,0000	0,5000	1,0000	0,3750
3	Jcps21	2,0000	0,5000	1,0000	0,3750
6	Jcda58	2,0000	0,5000	1,0000	0,3750
8	Jcda66	3,0000	0,5220	0,9773	0,4074
12	Jcps10	3,0000	0,5106	1,0000	0,3009
13	Jcps24	3,0000	0,0428	0,0217	0,0423
14	Jcps41	3,0000	0,5106	1,0000	0,3909
24	Jct27	5,0000	0,6155	0,9783	0,5392
Média		2,8750	0,4627	0,8722	0,3620

A heterosigose esperada (He) e observada (Ho) variaram de 0,0428 a 0,6155 (média = 0,4627) e 0,0217 a 1,0000 (média = 0,8722), respectivamente. Exceto para o loco Jcps10, todos os demais apresentaram valores superiores de heterosigose observada em relação à heterosigose esperada. Este fato pode ser

explicado pelo fato destes genótipos do banco de germoplasma não estarem em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Apesar da reduzida variabilidade genética, a heterozigosidade observada demonstra a presença de heterozigotos a serem explorados. Por outro lado, a baixa variabilidade genética do germoplasma avaliado, e a possível multiplicação anterior destes materiais por propagação assexuada, podem ter fixado indivíduos com os locos em heterozigose, devido a muitas alógamas sofrerem depressão por endogamia, como milho.

Os iniciadores Jcps9, 24 e 41 adquiriram valores de 1,000 para H_o em nosso trabalho, enquanto Rosado et al (2010) registraram valores de 0,00 para esta variável com estes iniciadores. Uma vez que este último trabalho utilizou outro indivíduos e um painel mais amplo, os resultados de heterozigosidade observada podem sofrer variações. No geral, valores semelhantes, mas não exatamente com os mesmos marcadores SSR, foram observados por Na-ek et al. (2011), sendo que as H_e e H_o variaram de 0,3047 a 0,7021 (média = 0,4478) e de 0 a 1 (média = 0,2656), respectivamente. Já no trabalho de mesma natureza desenvolvido por Sharma et al (2011), tanto a H_e quanto a H_o variaram de 0,1 a 0,5 (média = 0,2). No trabalho desenvolvido por Bressan et al (2012) tais valores variam de 0,25 a 0,77 (média = 0,66) para a H_e e de 0,24 a 0,90 (média = 0,53) para a H_o .

Quanto ao PIC, o menor valor de conteúdo de informação polimórfica foi apresentado pelo loco Jcps24 (PIC = 0,0423), significando que este é um iniciador que possui baixo conteúdo informativo. A condição de máximo conteúdo informativo ocorre quando todos os alelos apresentam frequências iguais (TESSIER et al., 1999), no caso do presente trabalho sendo representado pelo iniciador Jct27(PIC = 0,5392).

Pelos dados do marcador SSR apresentado, nota-se que este praticamente não detectou variabilidade genética entre os genótipos de pinhão-manso analisados. Tal observação está em acordo com os demais trabalhos de

mesma natureza, a exemplo Basha et al. (2009), Phumichai et al. (2011), Na-Ek et al. (2011) e Sun et al. (2008). Considerando estas informações utilizou-se um marcador multiloco, o ISSR, para inferir com maior amplitude sobre o grau de polimorfismo nesta coleção de pinhão-mansão.

4.2.2 ISSR

Na figura 5 apresenta-se o padrão de bandas gerados pelo marcador ISSR. De posse dos resultados dos cinco iniciadores ISSR empregados, observou que novamente houve baixo polimorfismo entre os materiais genéticos de pinhão-mansão analisados (Figura 5).

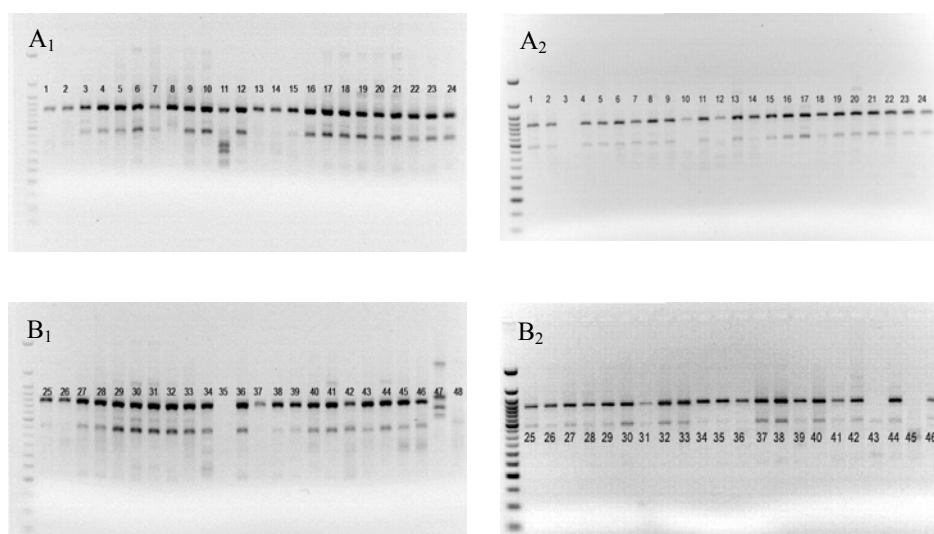


Figura 5 Imagem do gel de agarose com o padrão de bandas geradas pelos iniciadores ISSR: A ao B-VBV (AC)7; C ao D- BDB (CA)7; E ao F-BDV (AG) 7; G ao H-GCV (TC)7; I ao J-HBH (CT)7, para os 48 genótipos de *Jatropha*. * As numerações subscritas referem-se a primeira amplificação (1) e segunda amplificação (2) “Continua”

Fonte: EPAMIG, Caldas, MG (2011) (imagens geradas pela autora)

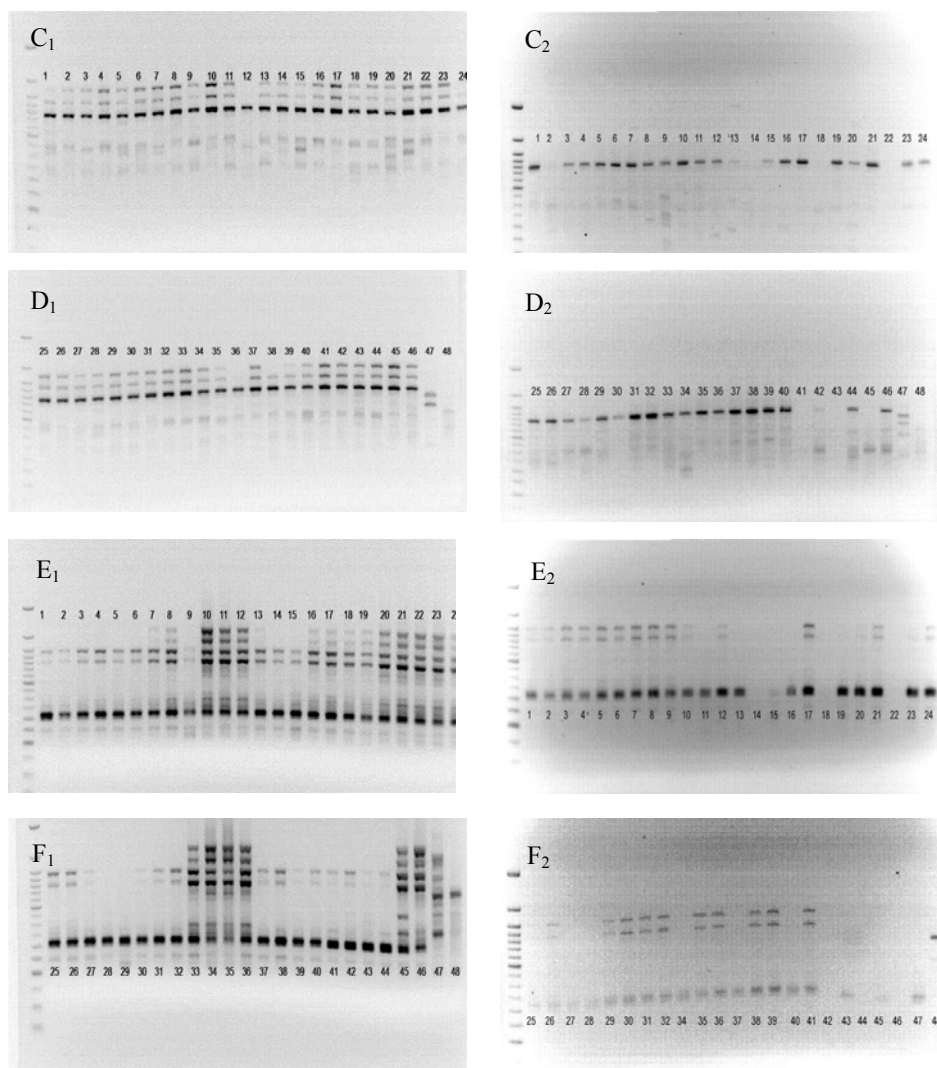


Figura 5 Imagem do gel de agarose com o padrão de bandas geradas pelos iniciadores ISSR: A ao B-VBV (AC)7; C ao D- BDB (CA)7; E ao F-BDV (AG) 7; G ao H-GCV (TC)7; I ao J-HBH (CT)7, para os 48 genótipos de *Jatropha*. * As numerações subscritas referem-se a primeira amplificação (1) e segunda amplificação (2) “Continua”

Fonte: EPAMIG, Caldas, MG (2011) (imagens geradas pela autora)

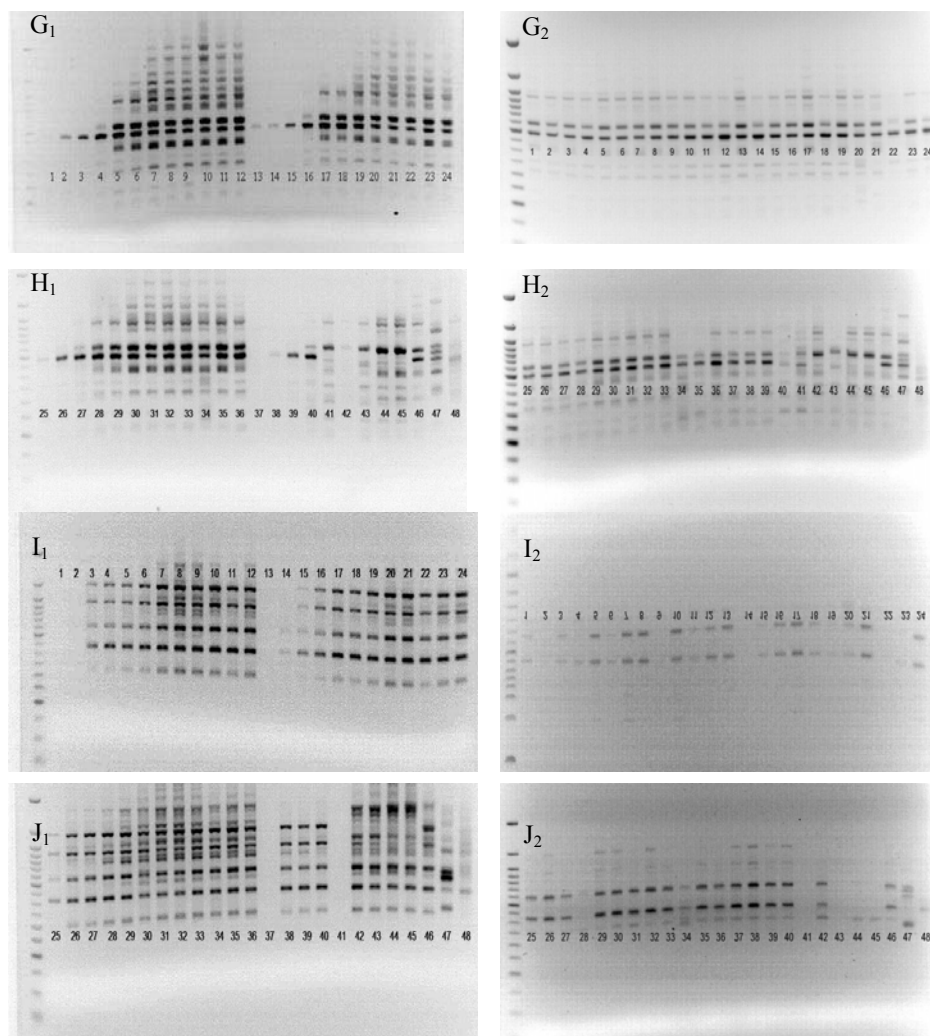


Figura 5 Imagem do gel de agarose com o padrão de bandas geradas pelos iniciadores ISSR: A ao B-VBV (AC)7; C ao D- BDB (CA)7; E ao F-BDV (AG) 7; G ao H-GCV (TC)7; I ao J-HBH (CT)7, para os 48 genótipos de *Jatropha*. * As numerações subscritas referem-se a primeira amplificação (1) e segunda amplificação (2)

Fonte: EPAMIG, Caldas, MG (2011) (imagens geradas pela autora)

Para melhor informatividade dos dados, confeccionou-se ainda a árvore fenética entre os genótipos, sendo possível agora a formação de 5 grupos (Figura 6).

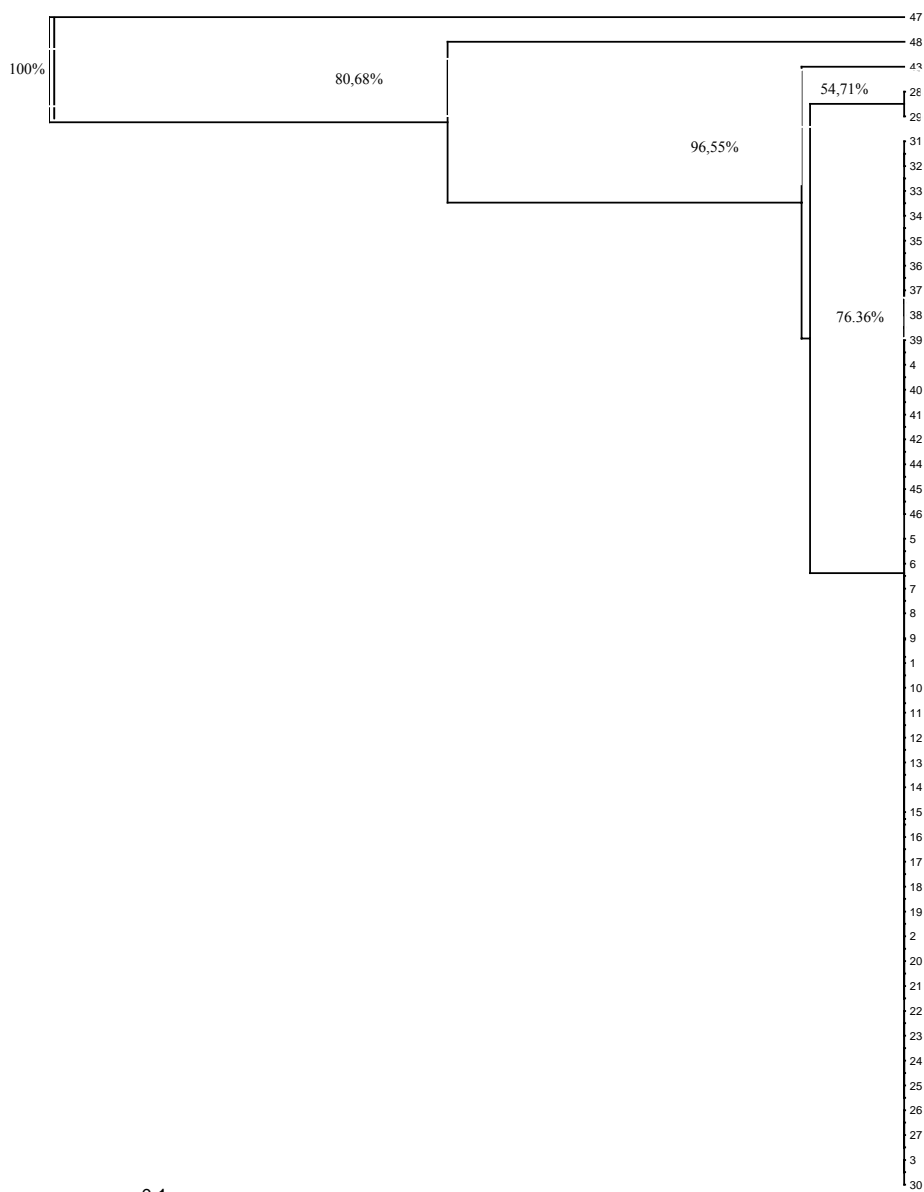


Figura 6 Árvore fenética UPGMA, gerada para ISSR pela distância Shared allele, demonstrando as relações genéticas entre os 48 genótipos de *Jatropha* analisados, sendo 46 genótipos de *J. curcas*, um genótipo de *J. podagrica* e um genótipo *J. molissima*.

Fonte: EPAMIG, Caldas, MG (2011) (elaborado pela autora)

Os dois grupos mais distantes continuam sendo pinhão-bravo e pinhão-ornamental. Quanto às plantas de pinhão-manso mexicano, exceto pelo genótipo 43 (BAG-JC-72_B) que continua separado num terceiro grupo, os demais representados por 42, 44 e 45 (BAG-JC-72_A, BAG-JC-71 e BAG-JC-84) tiveram perfil geneticamente igual ao das plantas de pinhão-manso nacionais, sendo agrupados em conjunto no quinto e maior grupo. O quarto grupo conteve somente dois genótipos de pinhão-manso brasileiros, representados pelos genótipos 28 e 29 (BAG-JC-01 e BAG-JC-02).

O número de locos que foi amplificado por estes iniciadores, foram 5 locos para o iniciador VBV, 3 locos para o BDB, 4 para o BDB, 7 para o GCV e 4 para o HBH. Devido ao menor tamanho do genoma do pinhão manso comparado com outras espécies, marcadores multilocos como os ISSR em geral amplificam menos locos.

De forma generalizada, o ISSR também detectou estreita variabilidade genética nesta coleção de pinhão-manso, fato que é corroborado por diversos autores utilizando-se do mesmo marcador, como Kumar et al. (2011) em plantas de pinhão-manso da Índia, Chen et al. (2011) na China, Grativol et al. (2011) no Brasil e Camellia, Thohirah e Abdullah (2012) na Malásia.

Analisando conjuntamente os dois marcadores pelo teste de Mantel, observou-se correlação significativa ($p < 0,01$) entre eles (0,81), portanto os dois marcadores praticamente não se contradizem com relação à caracterização genética de pinhão-manso, mostrando que o emprego de ambos é útil na caracterização genética dos genótipos do germoplasma norte mineiro de pinhão-manso. Entretanto, entre os dois marcadores, o ISSR foi mais polimórfico que o SSR, provavelmente por ser o ISSR multiloco e o SSR multialélico. Como a análise do SSR se baseia em pequenas regiões em locos únicos, esta termina por não ser representativa do genoma total (PAMIDIMARRI et al., 2011), portanto,

para que represente bem o genoma da espécie, maior número de marcadores SSR devem ser utilizados. No entanto, como explicado anteriormente deve-se ponderar a baixa amplificação e a limitada disponibilidade de novos marcadores SSR.

Teoricamente o marcador SSR gera grande robustez de resultados com relação à variabilidade genética, pois acessa as regiões SSR do genoma da planta, as quais são facilmente mutáveis e conseqüentemente são regiões de elevado polimorfismo. No entanto, Wang et al. (2011), ao criarem SSRs baseados na sequência do genoma do pinhão-manso, observaram a baixa ocorrência de variação genética nos locos SSRs da espécie. Os autores terminam por aconselhar que as razões sejam mais estudadas pois, se verídica, deve-se lançar mão de outros marcadores quando o intuito for a avaliação de polimorfismo nesta espécie. Mukherjee et al. (2011) também apoia este relato afirmando que o pinhão-manso exibe monomorfismo mesmo com marcadores SSRs.

Corroborando esta informação, Bressan et al. (2012) discutem que a maioria dos iniciadores SSRs publicados para o pinhão-manso abrangem pequeno número de alelos e na maioria das vezes são monomórficos. Os próprios autores fizeram o desenvolvimento de 40 iniciadores SSRs para esta espécie, mas dentre estes somente 9 foram polimórficos.

De forma genérica, o que se observa para ambos os marcadores estudados é que há distinção genética entre pinhão-bravo, pinhão-ornamental, e a maioria dos genótipos de pinhão-manso mexicano em relação aos nacionais. A distinção genética observada com relação às plantas de pinhão-manso mexicanas é uma resposta que tem o respaldo da literatura. He et al. (2011) mensuraram, por meio de AFLP, a diversidade genética entre genótipos de pinhão-manso de Madagascar e do México e observaram que a coleção mexicana é distinta e de diversidade genética mais ampla. Outra avaliação genética da coleção mexicana

foi feita por Pecina-Quintero et al. (2011), também por AFLP. Os autores detectaram alta diversidade genética, observando índices de diversidade de 60%, dentro do germoplasma de pinhão-mansão dessa região.

A distinção genética do pinhão-mansão mexicano é benéfica, pois como os genótipos de pinhão-mansão do BAG da EPAMIG aparentemente não são distintos entre si, culminam por serem inadequados para iniciar um programa de melhoramento pela ausência de variabilidade. Como o BAG possui em sua coleção os genótipos mexicanos, a realização de cruzamento entre esses genótipos é uma forma de recuperar a variabilidade demandada ao melhoramento.

Com relação à distinção genética do pinhão-bravo (*J. molissima*) e o ornamental (*J. podagrica*), deve-se considerar a distinção genética pelo gênero. No entanto é uma informação válida, pois como o pinhão-mansão apresenta baixa variabilidade genética, a possibilidade de cruzamento deste com outras espécies divergentes do mesmo gênero pode trazer benefícios ao melhoramento genético da espécie em questão.

Dentre as espécies estudadas com esse intuito, a *J. podagrica* foi contemplada. E, segundo Sujatha (2006), há compatibilidade de cruzamento entre pinhão-mansão e pinhão-ornamental, no entanto quando a mesma avaliação foi feita por Basha e Sujhata (2009), a hibridação entre as duas espécies não foi possível, por barreiras de cruzamento. Portanto, esta é uma informação que precisa ser mais esclarecida, pois o pinhão-mansão ornamental é divergente geneticamente do pinhão-mansão e essa variabilidade pode ser apreciada pelo melhoramento genético.

Segundo Surwenshi et al. (2011), como o pinhão-mansão é uma planta de polinização cruzada, a heterose pode ser explorada para a produção de variedades híbridas de pinhão-mansão, mediante cruzamento interespecífico. Segundo Sujatha (2006), a hibridação interespecífica tem imenso espaço para a

melhoria da arquitetura genética e atributos agronômicos do pinhão-mansão. Divakara et al. (2010) aconselham a hibridação em pinhão-mansão, uma vez que a planta floresce por longo período, possibilitando maior tempo de trabalho. Outro ponto positivo é que, devido à propagação vegetativa da espécie, o programa de melhoramento pode ser acelerado.

4.3 Teste de diversidade entre progênies do germoplasma norte mineiro de pinhão-mansão

Para averiguar de uma maneira mais detalhada a estreita variabilidade genética observada na coleção de pinhão-mansão norte mineira, conduziu-se um teste de progênies de meios-irmãos, onde foram avaliados possíveis padrões de segregação.

Comparando os genótipos maternos com seus respectivos genótipos filiais, foi constatada ausência de variabilidade genética entre os genótipos avaliados e suas progênies (Figura 8).

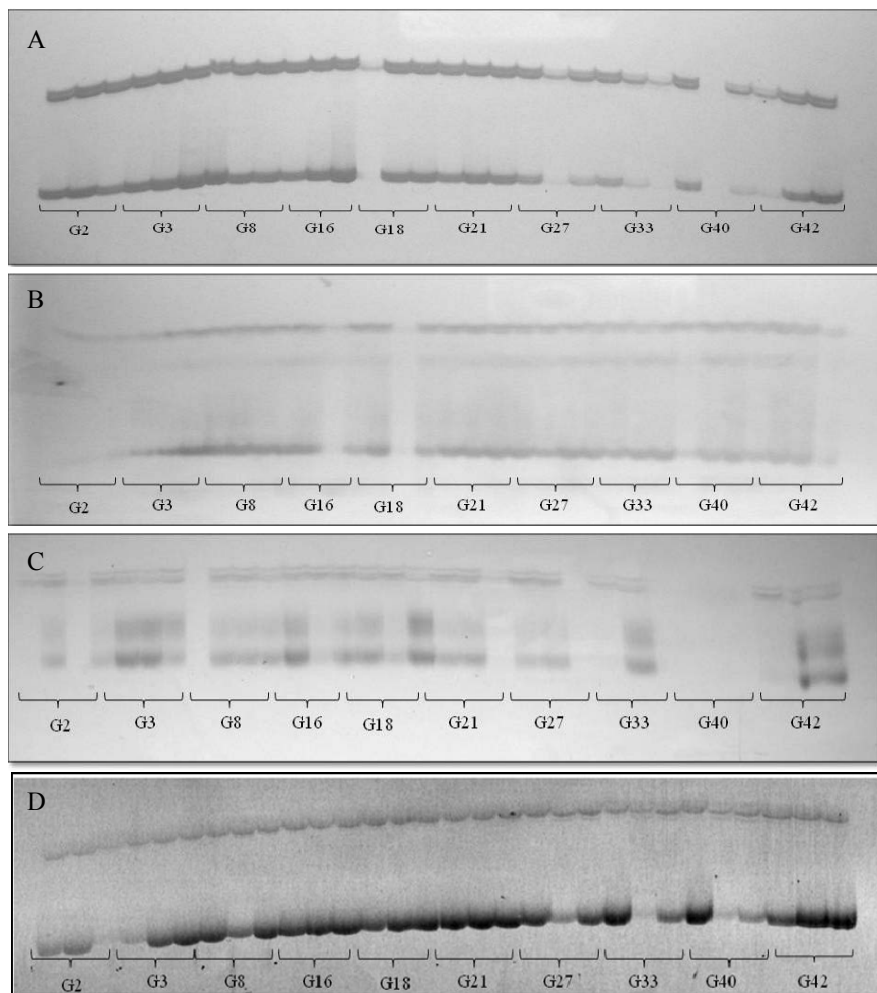


Figura 8 Imagem do gel de poliacrilamida mostrando o padrão de bandas geradas por SSRs. A) Marcador Jcps9; B) Marcador Jcps21; C) Marcador Jcjs58; D) Marcador Jcjs66; E) Marcador Jcps10; F) Marcador Jcps24; G) Marcador Jcps41; H) Marcador Jct27. Cada trinca consiste do genótipo maternal (G) e seus dois respectivos *bulks* de 10 indivíduos de meios-irmãos “Continua”

Fonte: EPAMIG, Caldas, MG (2011) (imagens geradas pela autora)

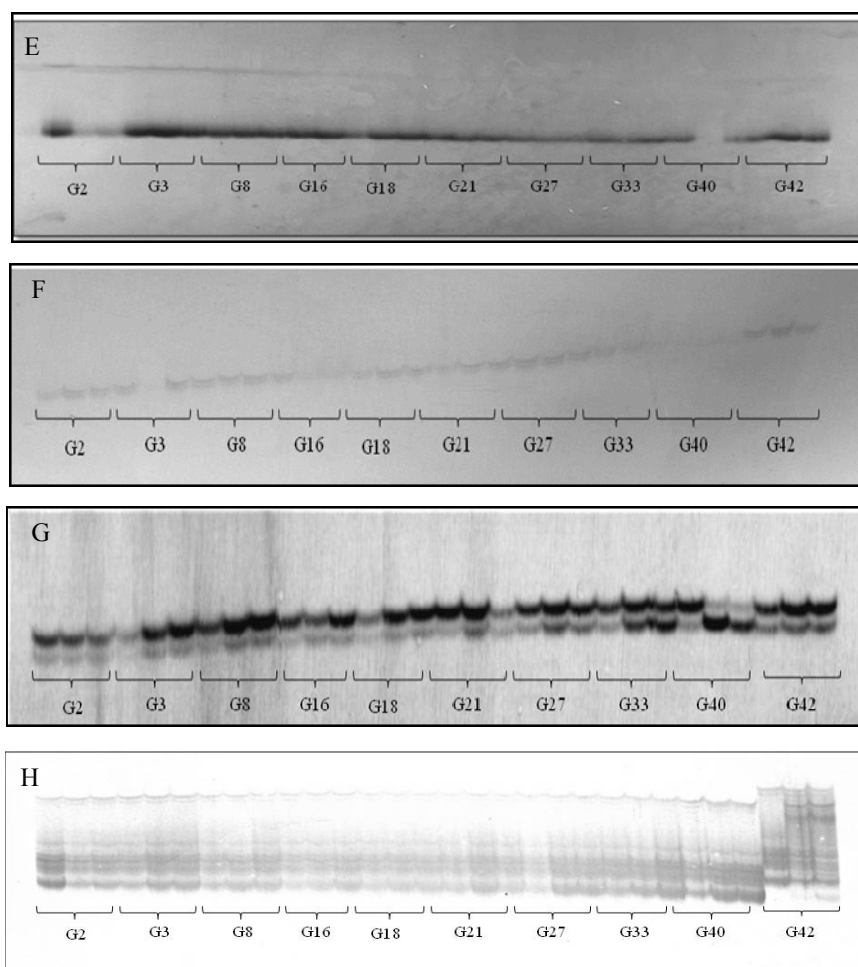


Figura 8 Imagem do gel de poliacrilamida mostrando o padrão de bandas geradas por SSRs. A) Marcador Jcps9; B) Marcador Jcps21; C) Marcador Jcjs58; D) Marcador Jcjs66; E) Marcador Jcps10; F) Marcador Jcps24; G) Marcador Jcps41; H) Marcador Jct27. Cada trinca consiste do genótipo maternal (G) e seus dois respectivos *bulks* de 10 indivíduos de meios-irmãos

Fonte: EPAMIG, Caldas, MG (2011) (imagens geradas pela autora)

Tratando-se o pinhão-mansão de uma espécie alógama, o padrão normal seria a visualização de segregação das progênies em relação a seus parentais, fato que não ocorreu. A esta observação pode-se retomar a discussão já realizada

e relatada na literatura, de que os locos SSRs do pinhão-mansão são pouco polimórficos (BRESSAN et al., 2012; MUKHERJEE et al., 2011; WANG et al., 2011). Assim, o monomorfismo observado entre parentais e progênies seria um comportamento limitado pela capacidade do marcador em amostrar regiões polimórficas do genoma.

Porém, o resultado observado pode sim ser referente à coleção em estudo, que apresenta estreita variabilidade genética mensurada tanto por SSR quanto ISSR. Sendo assim, mesmo que os indivíduos filiais consistam de meios irmãos, devido à reduzida diversidade genética que os genótipos doadores de pólen dessa coleção possuem, torna difícil a detecção de segregação genética entre eles. Apesar do padrão observado não se configurar normal, em decorrência dos resultados obtidos, este episódio torna-se aceitável momentaneamente.

Entretanto, atenção deve ser dispensada à ausência de segregação das progênies em relação a seus parentais, pois o pinhão-mansão trata-se de uma espécie alógama. Quando não se observa segregação em espécie alógama, esta pode estar sofrendo depressão por endogamia, fenômeno genético que se caracteriza pela perda de vigor, devido à homozigose de genes deletérios. A endogamia ocorre por autofecundação ou por acasalamento de indivíduos que possuem parentesco entre si.

A autofecundação, apesar de relatada em baixa frequência, não deve ser desconsiderada, pois sendo o pinhão-mansão uma espécie monóica autocompatível, existe a propensão à ocorrência de autofecundação. O acasalamento de indivíduos aparentados é propiciado pelo fato de uma pequena população de pinhão-mansão ter sido dispersa e soma-se a este fato a propagação assexuada praticada pelos pequenos agricultores que a cultivaram desde então. Outro ponto é que possivelmente a atual população de pinhão-mansão tem ancestrabilidade comum e, segundo Breda, Euclides e Pereira (2004), quanto

menor for o tamanho da população em gerações anteriores, maior será o número de ancestrais comuns e maior será o coeficiente de endogamia.

4.4 Discussão sobre o germoplasma norte mineiro de pinhão-mansó

No geral, os resultados gerados por citometria de fluxo e pelos dois marcadores moleculares se validam, pois ambos convergem à menção de baixa variabilidade genética no germoplasma de pinhão-mansó mantido pela EPAMIG no norte de Minas Gerais.

Soares (2010) também avaliou por intermédio de RAPD e ISSR genótipos de pinhão-mansó da região norte de Minas Gerais e afirma que, de maneira geral, são muito similares, apresentando baixa diversidade genética. Sendo assim, diante dos dados obtidos e corroborados por Santos et al. (2010), a suposição de Dias, Missio e Dias (2012) de que esta região pode ser um importante centro de diversidade do pinhão-mansó é fragilizada. Os autores se embasaram na alta variabilidade observada em caracteres agrônômicos do pinhão-mansó, como também mencionado por diversos autores na literatura (ABREU et al., 2009; FREITAS et al., 2011; GINWAL et al., 2004; LAVIOLA et al., 2010, 2011; SHABANIMOFRADA et al., 2013). No entanto, segundo Laviola et al. (2010) e Shabanimofrada et al. (2013), essas observações se devem ao fato de que a maioria dos caracteres agrônômicos do pinhão-mansó tem alta influência ambiental.

Portanto, enquanto a variabilidade genética observada entre os genótipos de pinhão-mansó é baixa, a variabilidade fenotípica é alta, sugerindo alta plasticidade fenotípica nesta espécie. Tal fato deve ser cuidadosamente considerado no melhoramento da espécie, pois significa que a maioria dos caracteres morfológicos são não herdáveis de uma geração a outra. Sendo assim, se selecionarmos genótipos baseados em caracteres morfológicos com tal

característica, incorreremos em erro no melhoramento, pois a próxima geração só exibirá o fenótipo selecionado se a condição ambiental se repetir. Deste modo, para a efetividade dos programas de melhoramento genético do pinhão-mansão, estes devem ser assistidos por marcadores moleculares, ou a seleção dos genótipos superiores deve ser baseada em caracteres de alta herdabilidade.

Apesar da variabilidade genética observada no germoplasma norte mineiro de pinhão-mansão ser restrita, esta não ocorre isoladamente. Tal detecção tem abrangência nacional. Rosado et al. (2010) utilizaram, dentre outros marcadores, o SSR para avaliar 192 genótipos de pinhão-mansão, obtidos de regiões que abrangiam a maior parte do território brasileiro. Os resultados indicaram que os genótipos se agrupavam, segundo a similaridade genética, em três grupos principais, sendo que um único grupo concentrava 97% dos genótipos avaliados. Os autores concluíram que a variabilidade genética existente nos genótipos de pinhão-mansão disponíveis no Brasil é baixa. Com relação ao ISSR, Grativol et al. (2011) se utilizaram deste para avaliar a diversidade genética em 332 genótipos de pinhão-mansão de oito estados brasileiros. Os autores utilizaram sete marcadores ISSR e observaram que os genótipos avaliados possuem estreita relação genética entre si. Os resultados dos distintos autores ao avaliarem coleções nacionais, com estes dois marcadores, corroboram com os resultados do presente trabalho ao avaliarem genótipos brasileiros de pinhão-mansão.

A baixa variabilidade genética dos genótipos nacionais de pinhão-mansão evidencia uma tendência observada em diversos países, desde os primeiros estudos com ambos os marcadores, tanto SSR (BASHA; SUJATHA, 2007, 2009; KUMAR et al., 2010; NA-EK et al., 2011; PAMIDIMARRI et al., 2011; PHUMICHAJ et al., 2011), quanto ISSR (ACTHEN et al., 2010; BASHA et al., 2009; PHUMICHAJ et al., 2011; SUN et al., 2008). Segundo Mukherjee et al. (2011), aproximadamente 75% de similaridade é exibido entre os genótipos

globais de pinhão-manso. Como a espécie *J. curcas* se trata de uma planta alógama, isso não é uma revelação comum e diante desta realidade, alguns autores sugerem a provável causa para tal manifestação.

4.5 Discussão sobre a baixa variabilidade genética do pinhão-manso

4.5.1 Sistema reprodutivo

Rosado et al. (2010), por exemplo, questionam o sistema reprodutivo do pinhão-manso, sugerindo a hipótese de um sistema reprodutivo por autofecundação. Tal suposição é pouco provável por revisão da literatura disponível sobre o assunto. Diversos autores assumem a predominância e eficiência da fecundação cruzada nesta espécie, por vários aspectos: raramente são encontradas flores femininas e masculinas abertas concomitantemente numa mesma inflorescência; por autofecundação espontânea apenas 20% das flores femininas desenvolvem-se em frutos; há aborto de 23% dos frutos formados por autofecundação, estes ainda têm 50% da germinação reduzida (CHANG-WEI et al., 2007; JUHÁSZ et al., 2009; KAUR et al., 2011; RAJU; EZRADANAM, 2002). O pinhão-manso também apresenta maior número de flores estaminadas em relação às pistiladas, estratégia que aumenta a disponibilidade de pólen na população e, conseqüentemente, a chance de polinização cruzada. Possuem flores unissexuais com modificação do sexo por estímulo ambiental, fenômeno que ocorre em 37 famílias de angiospermas, o qual tem a vantagem evolutiva de minimizar a geitonogamia e favorecer a xenogamia (CRUDEN, 1977; NEVES; MACHADO; VIANA, 2011).

4.5.2 Apomixia

Há o questionamento se a apomixia relatada nos estudos fitotécnicos com o pinhão-manso (BHATTACHARYA; KALYANI; SUBODH, 2005; CHANG-WEI et al., 2007; JUHÁSZ et al., 2009; KAUR et al., 2011) é a responsável pela restrita variabilidade genética. No entanto, com ferramentas mais refinadas como a citometria de fluxo, Ambrosi et al. (2010) garantem a não ocorrência de apomixia gametofítica na espécie, sugerindo o esclarecimento da ocorrência da apomixia esporofítica. Assim como Ambrosi et al. (2010), os resultados de citometria obtidos com as progênies de meio-irmãos avaliadas no presente trabalho, apontam para a não ocorrência de apomixia, visto que embriões apomíticos oriundos de endosperma materno possuem conteúdo de DNA superior ao de embriões zigóticos, fato que não foi observado.

4.5.3 Evolução

Até o momento, as três suposições apresentadas foram contestadas pela literatura. A baixa variabilidade genética no pinhão-manso, portanto, pode ser uma questão evolucionária. Esta espécie ao longo do tempo pode ter sofrido um processo de deriva genética, tanto por efeito fundador quanto por efeito gargalo, levando-o a um ganho de homogeneidade.

O pinhão-manso sofreu efeito fundador ao ter uma pequena amostra, não representativa de sua população, disseminada para Ásia, África, América do Norte e Sul, por intermédio dos navegantes portugueses há 400 anos (HELLER, 1996), proporcionando que um ambiente isolado fosse colonizado por genótipos extremamente semelhantes, o que ocasionou quebra na variabilidade genética da nova população em relação à original.

O pinhão-manso também pode ter sofrido o efeito gargalo de garrafa (*bottleneck*). Isso ocorre quando o tamanho de uma população é reduzido drasticamente devido ao processo de seleção (agronômica ou não) feito pelo

homem (HANCOCK, 2004; VEASEY et al., 2011). A ação humana reduzindo a população de pinhão-mansó é respaldada por Ambrosi et al. (2010) que afirmam que o pinhão-mansó a princípio não foi selecionado para características de produtividade e/ou qualidade. Assim o processo de seleção mal realizado reduziu a população, fazendo com que todos os genótipos de pinhão-mansó se originassem de seleções advindas do fenótipo de germoplasmas locais.

O fato da condução de uma pequena população de pinhão-mansó leva também a um ganho de homogeneidade, pois, segundo Morita (2008), em populações pouco numerosas, a taxa de homozigotos tende a crescer, pois a autofecundação e cruzamentos parentais são facilitados. Além disso, segundo Futuyma (2006), existe uma limitação física que não permite o cruzamento de todos com todos na mesma proporção, prevalecendo cruzamentos entre indivíduos próximos, acarretando também em uma diminuição dos heterozigotos.

Outro evento que leva a redução da variabilidade genética do pinhão-mansó, vem da argumentação de Ovando-Medina et al. (2011), que assegura que a disseminação do pinhão-mansó nas áreas rurais, ocorre há séculos pela propagação vegetativa. Sendo assim, além de poucos genótipos de pinhão-mansó terem sido disseminados, há tempos os mesmos vem sendo clonados devido à propagação vegetativa realizada pelos agricultores. Deve-se considerar também que estes indivíduos altamente aparentados permanecem a várias gerações cruzando entre si.

Todos os argumentos para o cenário de baixa variabilidade genética do pinhão-mansó devem ser ponderados. Realidade é que a razão para a baixa variabilidade genética no germoplasma de pinhão-mansó a nível global, não está bem elucidada (MUKHERJEE et al., 2011).

O trabalho mais abrangente sobre a diversidade genética do pinhão-mansó a nível global foi o conduzido por Basha et al. (2009) e os autores

observaram apenas dois agrupamentos. O primeiro estruturou os indivíduos da América Central e o outro agrupou os indivíduos dos demais países. Sendo assim, mais pesquisas devem ser conduzidas, com coleções mais divergentes em países, ou seja, um BAG internacional de pinhão-manso, visando-se assim o esclarecimento do assunto.

5 CONCLUSÃO

Por citometria de fluxo, marcadores SSR e ISSR detectou-se reduzida variabilidade genética entre os genótipos de pinhão-manso do germoplasma da EPAMIG de Nova Porteirinha.

REFERÊNCIAS

- ABDU-AGUYE, I. A. et al. Acute toxicity studies with *Jatropha curcas*. **Human Toxicology**, Lyon, v. 5, n. 4, p. 269-274, 1986.
- ABREU, F. B. et al. Variabilidade genética entre acessos de pinhão-manso na fase juvenil. **Magistra**, Salvador, v. 21, n. 1, p. 36-40, 2009.
- ACHTEN, W. M. J. et al. Towards domestication of *Jatropha curcas*. **Biofuels**, London, v. 1, n. 1, p. 91-107, 2010.
- ADEBOWALE, K. O.; ADEDIRE, C. O. Chemical composition and insecticidal properties of the underutilized *Jatropha curcas* seed oil. **African Journal of Biotechnology**, Pretoria, v. 5, n. 10, p. 901-906, Oct. 2006.
- AKINTAYO, E. T. Characteristics and composition of *Parkia biglobbosa* and *Jatropha curcas* oils and cakes. **Bioresource Technology**, Essex, v. 92, n. 3, p. 307-310, June 2004.
- ALMEIDA, C. M. A. et al. Caracterização molecular de cultivares de cana-de-açúcar utilizando marcadores ISSR. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, p. 1771-1776, set. 2009. Número especial.
- AMBROSI, D. G. et al. DNA Markers and FCSS analyses shed light on the genetic diversity and reproductive strategy of *Jatropha curcas* L. **Diversity**, Bethesda, v. 2, n. 5, p. 810-836, May 2010.
- ARNAU, G.; LALLEMAND, J.; BOURGOIN, M. Fast and reliable strawberry cultivar identification using inter simple sequence repeat (ISSR) amplification. **Euphytica**, Dordrecht, v. 129, n. 1, p. 69-79, Feb. 2002.
- ARRUDA, F. P. et al. Cultivo de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) como alternativa para o semi-árido Nordeste. **Revista Brasileira de Fibrosas**, Campina Grande, v. 8, n. 1, p. 789-799, abr. 2004.
- ASKER, S. E.; JERLING, L. **Apomixis in plants**. Boca Raton: CRC, 1992. 298 p.
- BASHA, S. D. et al. A comparative study of biochemical traits and molecular markers for assessment of genetic relationships between *Jatropha curcas* L. germplasm from different countries. **Plant Science**, Limerick, v. 176, n. 6, p. 812-823, June 2009.

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

_____. Inter and intra-population variability of *Jatropha curcas* (L.) characterized by RAPD and ISSR markers and development of population-specific SCAR markers. **Euphytica**, Dordrecht, v. 156, n. 3, p. 375-386, Feb. 2007.

BENNET, M.; LEITCH, I. Nuclear DNA amounts in angiosperms: 583 new estimates. **Annals of Botany**, London, v. 80, n. 2, p. 169-196, Feb. 1997.

BENNETT, S. T.; BENNETT, M. D. Variation in nuclear DNA amount between wild and cultivated populations of *Milium effusum* ($2n = 28$). **Genome**, Ottawa, v. 35, n. 6, p. 1050-1053, June 1992.

BHATTACHARAYA, A.; KALYANI, D.; SUBODH, K. D. Floral biology, floral resource constraints and Pollination Limitation in *Jatropha curcas* L. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, Faisalabad, v. 8, n. 3, p. 456-460, June 2005.

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

BREDA, F. C.; EUCLYDES, R. F.; PEREIRA, C. S. Endogamia e limite de seleção em populações selecionadas obtidas por simulação. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 33, n. 6, p. 2017-2025, jun. 2004.

BRESSAN, E. A. et al. Development of microsatellite primers for *Jatropha curcas* (Euphorbiaceae) and transferability to congeners. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 99, n. 6, p. 237-239, June 2012.

CABRAL, E. M. F. de M. **Caracterização molecular de variedades de nogueira (*Juglans regia* L.)**. 2008. 130 p. Dissertação (Mestrado em Controle de Qualidade) - Universidade do Porto, Porto, 2008.

CACERES, M. E. et al. Genome size variations within *Dasypyrum villosum*: correlations with chromosomal traits, environmental factors and plant phenotypic characteristics and behavior in reproduction. **Theoretical and Applied Genetics**, Heidelberg, v. 96, n. 5, p. 559-567, Sept. 1998.

- CAMELLIA, N. N. A.; THOHIRAH, L. A.; ABDULLAH, N. A. P. Genetic relationships and diversity of *Jatropha curcas* accessions in Malaysia. **African Journal of Biotechnology**, Pretoria, v. 11, n. 13, p. 3048-3054, July 2012.
- CARVALHO, C. R. et al. Genome size, base composition and karyotype of *Jatropha curcas* L., an important biofuel plant. **Plant Science**, Oxford, v. 174, n. 6, p. 613-617, June 2008.
- CHAMBERS, G. K.; MACAVOY, E. S. Microsatellites: consensus and controversy. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Amsterdam, v. 126, n. 4, p. 455-476, Apr. 2000.
- CHANG-WEI, L. et al. Floral display and breeding system of *Jatropha curcas* L. **Forestry Studies in China**, Beijing, v. 9, n. 2, p. 114-119, Apr. 2007.
- CHEN, K. et al. Genetic relationships among *Jatropha curcas* L. clones from Panzhihua, China as revealed by RAPD and ISSR. **African Journal of Agricultural Research**, Pretoria, v. 6, n. 11, p. 2582-2585, Nov. 2011.
- CIPRIANI, G. et al. A set of microsatellite markers with long core repeat optimized for grape (*Vitis* spp.) genotyping. **BMC Plant Biology**, London, v. 8, n. 127, p. 1-13, 2008.
- COELHO, A. S. G. dBood: avaliação de dendrogramas baseados em estimativas de distâncias/similaridades genéticas através do procedimento de bootstrap: versão 3.01. Goiânia: Universidade Federal de Goiás, 2001. 1 CD-ROM.
- CORRÊA, M. P. **Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, 1952. v. 3, 646 p.
- CORTESÃO, M. **Culturas tropicais: plantas oleaginosas, coqueiro, rícino, purgueira e aleurites**. Lisboa: Livraria Clássica, 1957. 180 p.
- CRESTE, S.; TULMANN-NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detection of simple sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrilamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology Report**, Atenas, v. 19, n. 4, p. 299-306, Aug. 2001.
- CRUDEN, R. W. Pollen-ovule ratios: a conservative indicator of breeding systems in flowering plants. **Evolution**, Lancaster, v. 31, n. 5, p. 32-46, 1977.

CRUZ, C. D. T. M. **Abordagem fisiológica e molecular da capacidade de tolerância à seca de *Jatropha curcas* L.:** uma planta resistente à seca. 2010. 72 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Humana e Ambiente) - Universidade de Lisboa, Lisboa, 2010.

DALL'AGNOL, M.; SCHIFINO-WITTMANN, M. T. Apomixia, genética e melhoramento de plantas. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 11, n. 2, p. 127-133, 2005.

DEHGAN, B. Phylogenetic significance of interspecific hybridization in *Jatropha* (Euphorbiaceae). **Systematic Botany**, Kent, v. 9, n. 10, p. 467-478, Oct. 1984.

DEHGAN, B.; WEBSTER, G. Morphology and infrageneric relationships of the genus *Jatropha* (Euphorbiaceae). **Botany**, Davis, v. 74, n. 13, p. 1-73, 1979.

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**, Ribeirão Preto, v. 11, n. 3, p. 2719-2728, May/June 2012.

DIVAKARA, B. N. et al. Biology and genetic improvement of *Jatropha curcas* L.: a review. **Applied Energy**, London, v. 87, n. 3, p. 732-742, Mar. 2010.

DOW, B. D.; ASHLEY, M. V. High levels of gene flow in bur oak revealed by paternity analysis using microsatellites. **Journal of Heredity**, Cary, v. 89, n. 1, p. 62-70, Jan. 1998.

DRUMMOND, O. A. et al. **Cultura do pinhão manso**. Janaúba: EPAMIG, 1984. 131 p.

DRUMOND, M. A. et al. Desempenho agronômico de genótipos de pinhão manso no semi-árido pernambucano. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 1, p. 44-47, jan./fev. 2009.

EMIL, A. et al. Characteristic and composition of *Jatropha curcas* oil seed from Malaysia and its potential as biodiesel feedstock. **European Journal of Scientific Research**, Dordrecht, v. 29, n. 3, p. 396-403, Mar. 2009.

EMPERAIRE, L. F.; PINTO, N. Dona Flora et les cajous: deux systèmes agricoles au sudest du Piauí, Brésil. **Journal d'Agriculture Traditionnel et de Botanique Appliqué**, Paris, v. 33, n. 3, p. 193-212, 1986.

EVARISTO, A. B. et al. Produção de mudas de pinhão manso em diferentes densidades populacionais. **Revista Agrotecnologia**, Anápolis, v. 2, n. 2, p. 1-13, mar./abr. 2011.

FOIDL, N. et al. *Jatropha curcas* L. as a source for the production of biofuel in Nicaragua. **Bioresource Technology**, Essex, v. 58, n. 1, p. 77-82, Feb. 1996.

FRANKEN, Y. J.; NIELSEN, F. **Jatropha handbook**. Eindhoven: FACT, 2009. 23 p.

FREITAS, R. G. et al. Genetic evaluation of *Jatropha curcas*: an important oilseed for biodiesel production. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 10, n. 3, p. 1490-1498, May/June 2011.

FUTUYMA, D. J. **Evolutionary biology**. Sunderland: Sinauer Associates, 2006. 763 p.

GINWAL, H. S. et al. Seed source variation in morphology, germination and seedling growth of *Jatropha curcas* Linn. in Central India. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 54, n. 2, p. 76-80, Feb. 2005.

GRATIVOL, C. et al. 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**, Athens, v. 38, n. 2, p. 4245-4256, Feb. 2011.

GUPTA, P. K.; VARSHNEY, R. K. The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with emphasis on bread wheat. **Euphytica**, Wageningen, v. 113, n. 3, p. 163-185, Mar. 2000.

HANCOCK, J. F. Contributions of domesticated plant studies to our understanding of plant evolution. **Annals of Botany**, London, v. 96, n. 6, p. 953-963, Dec. 2005.

HE, W. et al. Analysis of seed phorbol-ester and curcumin content together with genetic diversity in multiple provenances of *Jatropha curcas* L. from Madagascar and Mexico. **Plant Physiology and Biochemistry**, New Delhi, v. 49, n. 10, p. 1-8, Oct. 2011.

HELLER, J. **Investigation of the genetic potential and improvement of cultivation and propagation practices of physic nut (*Jatropha curcas* L.)**. Berlin: German Agency for Technical Cooperation, 1991. 47 p.

_____. Physic nut *Jatropha curcas* L. promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. In: INTERNATIONAL PLANT GENETIC RESOURCES INSTITUTE, 1., 1996, Rome. **Proceedings...** Rome: FAO, 1996. 1 CD-ROM.

JIMÉNEZ, R. J.; MARTÍNEZ, M. Redescrición de *Jatropha andrieuxii* Muell. Arg. (Euphorbiaceae), una especie endémica del Sur de México. **Acta Botánica Mexicana**, Toluca, v. 26, n. 7, p. 27-32, 1994.

JUHÁSZ, A. C. P. et al. Biologia floral e polinização artificial de pinhão-manso no norte de Minas Gerais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 44, n. 9, p. 1073-1077, set. 2009.

KATHIRAVAN, A. S.; PONNUSWAMY, A. S.; VANITHA, C. Determination of suitable cutting size for vegetative propagation and comparison of propagules to evaluate the seed quality attributes in *Jatropha curcas* Linn. **Natural Product Radiance**, New Delhi, v. 8, n. 2, p. 162-166, Apr. 2009.

KAUR, K.; DHILLON, G. P. S.; GILL, S. Floral biology and breeding system of *Jatropha curcas* in north-western India. **Journal of Tropical Forest Science**, Kuala Lumpur, v. 23, n. 1, p. 4-9, Jan. 2011.

KUMAR, S. et al. Genetic diversity assessment of *Jatropha curcas* L. germplasm from Northeast India. **Biomass and Bioenergy**, Oxford, v. 35, n. 7, p. 3063-3070, July 2011.

_____. Stable genetic transformation of *Jatropha curcas* via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene transfer using leaf explants. **Industrial Crops and Products**, London, v. 32, n. 1, p. 41-47, Jan. 2010.

LATTA, R. G. et al. Direct and indirect estimates of seed versus pollen movement within a population of ponderosa pine. **Evolution**, Lancaster, v. 52, n. 1, p. 61-67, Feb. 1998.

LAVIOLA, B. G. et al. Caracterização morfo-agronômica do banco de germoplasma de pinhão-manso na fase jovem. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 27, n. 3, p. 371-379, 2011.

LAVIOLA, B. G. et al. Genetic improvement of *Jatropha* for biodiesel production. **Ceiba**, Tegucigalpa, v. 51, n. 1, p. 1-10, 2010.

_____. Genetic parameters and variability in physic nut accessions during early developmental stages. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 45, n. 6, p. 1117-1123, jun. 2010.

LIMA, R. L. S. et al. Comprimento das estacas e parte do ramo para formação de mudas de pinhão-manso. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 14, n. 11, p. 1234-1239, nov. 2010.

MADAIL, R. H. **Descritores morfológicos e conteúdo de DNA na caracterização de acessos de bananeira**. 2011. 104 p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

MAGHULY, F. et al. Investigation of genetic variation in *Jatropha curcas* by Ecotilling and ISSR. **BMC Proceedings**, London, v. 5, n. 7, p. 1-2, 2011.

MANTEL, N. A. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. **Cancer Research**, Baltimore, v. 27, n. 1, p. 209-220, 1967.

MARTIN, G.; MAYEUX, A. Réflexions sur les cultures oléagineuses énergétiques: II., le pourghère (*Jatropha curcas* L.): un carburant possible. **Oléagineux**, Paris, v. 39, p. 283-287, 1984.

MATOS, F. S. et al. Influência da intensidade luminosa no desenvolvimento de mudas de *Jatropha curcas* L. **Revista Agrarian**, Dourados, v. 4, n. 14, p. 265-272, 2011.

MATZK, F.; HAMMER, K.; SCHUBERT, I. Coevolution of apomixis and genome size within the genus *Hypericum*. **Sexual Plant Reproduction**, New York, v. 16, n. 1, p. 51-58, Feb. 2003.

MISHRA, D. K. Selection of candidate plus phenotypes of *Jatropha curcas* L. using method of paired comparisons. **Biomass and Bioenergy**, Oxford, v. 33, n. 3, p. 542-545, Mar. 2009.

MORITA, C. M. **Diversidade genética por marcadores SSRs de progênies de *Tabebuia heptaphylla* da região da bacia do médio Tietê**. 2008. 49 p. Monografia (Graduação em Biologia) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2008.

MUKHERJEE, P. et al. *Jatropha curcas*: a review on biotechnological status and challenges. **Plant Biotechnology Reports**, London, v. 5, n. 3, p. 197-215, Mar. 2011.

NA-EK, Y. et al. Genetic diversity of physic nut (*Jatropha curcas* L.) revealed by SSR markers. **Journal of Crop Science and Biotechnology**, London, v. 14, n. 2, p. 105-110, Apr. 2011.

NEVES, E. L.; MACHADO, I. C.; VIANA, B. F. Sistemas de polinização e de reprodução de três espécies de *Jatropha* (Euphorbiaceae) na Caatinga, semi-árido do Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 34, n. 4, p. 553-563, jul./ago. 2011.

NUNES, C. F. et al. An improved method for genomic DNA extraction from strawberry leaves. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 8, p. 1383-1389, ago. 2011.

NYGREN, A. Apomixis in angiosperms: part II. **Botanical Review**, Bronx, v. 20, n. 1, p. 577-649, 1954.

OLIVEIRA, A. C. L. **Citometria de fluxo e redes neurais artificiais em variedades de bananeira, figueira, macieira e pessegueiro**. 2011. 125 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

OVANDO-MEDINA, I. et al. State of the art of genetic diversity research in *Jatropha curcas*. **Scientific Research and Essays**, Victoria, v. 6, n. 8, p. 1709-1719, Aug. 2011.

PAIVA NETO, V. B. et al. Aspectos da biologia reprodutiva de *Jatropha curcas* L. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 3, p. 558-563, maio/jun. 2010.

PAMIDIMARRI, D. V. et al. Cross species amplification ability of novel microsatellites isolated from *Jatropha curcas* and genetic relationship with sister taxa cross species amplification and genetic relationship of *Jatropha* using novel microsatellites. **Molecular Biology Reports**, Dordrecht, v. 38, n. 2, p. 1383-1388, Feb. 2011.

_____. Isolation of novel microsatellites from *Jatropha curcas* L. and their cross-species amplification. **Molecular Ecology Resources**, Oxford, v. 9, n. 1, p. 431-433, Jan. 2009.

- PEAKALL, R.; SMOUSE, P. E. GENALEX 6: genetic analysis in excel: population genetic software for teaching and research. **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v. 6, n. 1, p. 288-295, Mar. 2006.
- PECINA-QUINTERO, V. et al. Molecular characterisation of *Jatropha curcas* L. genetic resources from Chiapas, México through AFLP markers. **Biomass and Bioenergy**, Oxford, v. 35, n. 5, p. 1897-1905, May 2011.
- PEIXOTO, A. R. **Plantas oleaginosas arbóreas**. São Paulo: Nobel, 1973. 282 p.
- PHUMICHAJ, C. et al. Isolation of 55 microsatellite markers for *Jatropha curcas* and its closely related species. **Biologia Plantarum**, Copenhagen, v. 55, n. 2, p. 387-390, Feb. 2011.
- PURCINO, A. A. C.; DRUMMOND, A. O. **Pinhão manso**. Belo Horizonte: EPAMIG, 1986. 7 p.
- RAJU, A. J. S.; EZRADANAM, V. Pollination ecology and fruiting behaviour in a monoecious species, *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae). **Current Science**, Columbus, v. 83, n. 11, p. 1395-1398, Nov. 2002.
- REEVES, G. et al. Genome size is negatively correlated with altitude in natural populations of *Dactylis glomerata*. **Annals of Botany**, London, v. 82, n. 1, p. 99-105, Mar. 1998.
- ROSADO, T. B. et al. Molecular markers reveal limited genetic diversity in a large germplasm collection of the biofuel crop *Jatropha curcas* L. in Brasil. **Crop Science**, Madison, v. 50, n. 6, p. 2372-2382, June 2010.
- SAKAGUCHI, S.; SOMABHI, M. **Exploitation of promising crops of Northeast Thailand**. Wooster: Agricultural Development Research Center, 1987. 61 p.
- SANTOS, C. M. et al. Fenologia e crescimento do pinhão-manso cultivado na zona da mata do estado de alagoas, Brasil. **Scientia Agraria**, Curitiba, v. 11, n. 3, p. 201-209, 2010.
- SANTOS, M. J.; MACHADO, I. C.; LOPES, A. V. Biologia reprodutiva de duas espécies de *Jatropha* L. (Euphorbiaceae) em Caatinga, Nordeste do

Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 28, n. 2, p. 361-373, abr./jun. 2005.

SATURNINO, H. M. et al. Cultura do pinhão manso (*Jatropha curcas* L.). **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 26, n. 229, p. 44-78, 2005.

SCHLÖTTERER, C. The evolution of molecular markers: just a matter of fashion? **Nature Reviews Genetics**, London, v. 5, n. 1, p. 63-69, 2004.

SEBBENN, A. M. Tamanho amostral para conservação ex situ de espécies arbóreas com sistema misto de reprodução. **Revista do Instituto Florestal**, São Paulo, v. 15, n. 2, p. 109-124, 2003.

SEBBENN, A. M. et al. Taxa de cruzamento em populações de *C. legalis* (Mart.) O. Ktze. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v. 58, n. 1, p. 25-40, 2002.

SHABANIMOFRADA, M. et al. Phenotypic, genotypic and genetic divergence found in 48 newly collected Malaysian accessions of *Jatropha curcas* L. **Industrial Crops and Products**, London, v. 42, n. 1, p. 543-551, 2013.

SHARMA, A.; CHAUHAN, R. S. Repertoire of SSRs in the castor bean genome and their utilization in genetic diversity analysis in *Jatropha curcas*. **Comparative and Functional Genomics**, Chichester, v. 1, n. 1, p. 1-9, Mar. 2011.

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

SUJATHA, M. Genetic improvement of *Jatropha curcas* L. possibilities and prospects. **Indian Journal of Forestry**, Ghaziabad, v. 8, n. 2, p. 58-65, 2006.

SUKARIN, W.; YAMADA, Y.; SAKAGUCHI, S. Characteristics of physic nut, *Jatropha curcas* L. as a new biomass crop in the tropics. **Japan Agricultural Research Quarterly**, Tokyo, v. 20, n. 1, p. 302-303, 1987.

SUN, Q. B. et al. SSR and AFLP markers reveal low genetic diversity in the biofuel plant *Jatropha curcas* in China. **Crop Science**, Madison, v. 48, n. 5, p. 1865-1871, May 2008.

SURWENSHI, A. et al. Critical review of diversity in *Jatropha curcas* for crop improvement: a candidate biodiesel crop. **Research Journal of Agricultural Sciences**, Timisoara, v. 2, n. 2, p. 193-198, Feb. 2011.

TANYA, P. et al. Genetic diversity among *Jatropha* and *Jatropha*-related species based on ISSR markers. **Plant Molecular Biology Reports**, Amsterdam, v. 29, n. 1, p. 252-264, Jan. 2011.

TEIXEIRA, L. C. Potencialidades de oleaginosas para produção de biodiesel. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 26, n. 229, p. 18-27, 2005.

TEMSCH, E. M.; GREILHUBER, J. Genome size variation in *Arachis hypogaea* and *A. monticola* re-evaluated. **Genome**, Ottawa, v. 43, n. 3, p. 449-451, June 2000.

TESSIER, C. et al. Optimization of the choice of molecular markers for varietal identification in *Vitis vinifera* L. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 89, n. 1, p. 171-177, Feb. 1999.

TING, I. P.; STERNBERG, L. O.; DENIRO, M. J. Variable photosynthetic metabolism in leaves and stems of *Cissus quadrangularis* L. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 71, n. 3, p. 677-679, 1983.

VEASEY, E. A. et al. Processos evolutivos e a origem das plantas cultivadas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 7, p. 1218-1228, jul. 2011.

WANG, C. M. et al. A first generation microsatellite and SNP based linkage map of *Jatropha*. **Plos One**, San Francisco, v. 6, n. 8, p. 1-8, Aug. 2011.

WANG, H. Z. et al. Phylogenetic study and molecular identification of 31 *Dendrobium* species using inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 122, n. 3, p. 440-447, June 2009.

WERPACHOWSKI, J. S.; VARASSIN, I. G.; GOLDENBERG, R. Ocorrência de apomixia e partenocarpia em algumas espécies subtropicais de *Asteraceae*. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 27, n. 3, p. 607-613, Sept. 2004.

WHANKAEW, S. et al. Cross-genera transferability of (simple sequence repeat) SSR markers among cassava (*Manihot esculenta* Crantz), rubber tree (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) and physic nut (*Jatropha curcas* L.). **African Journal of Biotechnology**, Pretoria, v. 10, n. 10, p. 1768-1776, Oct. 2011.

WU, J. et al. A study on structural features in early flower development of *Jatropha curcas* L. and the classification of its inflorescences. **African Journal of Agricultural Research**, Pretoria, v. 6, n. 2, p. 275-284, Feb. 2011.

YE, M. et al. Current situation and prospects of *Jatropha curcas* as a multipurpose tree in China. **Agroforestry Systems**, Heibelberg, v. 76, n. 1, p. 487-497, Jan. 2009.