



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA
CURSO DE AGRONOMIA**

LINDA BRENNA RIBEIRO ARAÚJO

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ACESSOS E FAMÍLIAS DE MEIOS-
IRMÃOS DE PINHÃO MANSO**

FORTALEZA

2015

LINDA BRENNA RIBEIRO ARAÚJO

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ACESSOS E FAMÍLIAS DE MEIOS-IRMÃOS
DE PINHÃO MANSO

Monografia apresentada ao Curso de Agronomia do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará, como parte das exigências da Disciplina Atividade Supervisionada.

Orientador: Prof^ª. D.Sc. Cândida Hermínia Campos de Magalhães Bertini.

FORTALEZA

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

-
- A69c Araújo, Linda Brenna Ribeiro.
Caracterização molecular de acessos e famílias de meios-irmãos de pinhão manso / Linda Brenna Ribeiro Araújo. – 2015.
52 f.: il. color.
- Monografia (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Fitotecnia, Graduação em Agronomia, Fortaleza, 2015.
Orientação: Profa. Dra. Cândida Hermínia Campos de Magalhães Bertini.
1. Pinhão-manso. 2. Variação genética. I. Título.

CDD 631

LINDA BRENNA RIBEIRO ARAÚJO

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ACESSOS E FAMÍLIAS DE MEIOS-
IRMÃOS DE PINHÃO MANSO

Monografia apresentada ao Curso de
Agronomia do Centro de Ciências
Agrárias da Universidade Federal do
Ceará, como parte das exigências da
Disciplina Atividade Supervisionada.

Aprovada em: 26/06/2015.

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dra. Cândida H. Campos de Magalhães Bertini
(Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof.^a Dra. Rosilene de Oliveira Mesquita
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Me. Eveline Nogueira Lima
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus.

Aos meus pais, Almir e Salete.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida, pela saúde e por todas as conquistas alcançadas.

Aos meus pais, Almir e Salete, pelo grande exemplo e por todo o esforço e dedicação para com nossa família. Vocês são os responsáveis por essa conquista!

Ao meu irmão, Filipe, pelos ensinamentos e companheirismo.

Às famílias Ribeiro e Araújo, por todo o apoio durante a vida.

Ao Gilberto, pela grande ajuda, compreensão, companheirismo e ensinamentos, fazendo de mim uma pessoa melhor e tornando meus dias mais felizes.

À Professora Cândida, pelos grandes ensinamentos, dedicação e paciência.

À Professora Rosilene Mesquita, à Dra. Patrícia Bordallo e à Me. Eveline Lima, pelas importantes contribuições.

À equipe do Laboratório de Biotecnologia e Melhoramento de Plantas, pelo companheirismo e ajuda nos experimentos.

À equipe do Laboratório de Virologia Vegetal, pelo grande apoio e contribuições.

Aos queridos amigos feitos durante a graduação: Leanderson, Charles, Selma, Edibergue, Diana, Aline, Eduardo, Júlio, Alberto, Antônio Neto, Georjane, Ronaldo e Wener.

Ao PIBIC/CNPQ pela concessão da bolsa de iniciação científica.

“Peçam, e lhes será dado; busquem, e encontrarão; batam, e a porta lhes será aberta”
(Matheus 7:7-8)

RESUMO

O pinhão manso é uma Euphorbiaceae de ampla distribuição nas zonas intertropicais do planeta e que vem sendo utilizado há séculos para fins diversos. Mais recentemente o óleo de pinhão manso foi descoberto como uma boa alternativa para ser explorado como fonte de produção de biodiesel, por apresentar propriedades químicas e físicas valiosas, bem como boa resistência ao estresse hídrico e estimativas de baixo custo de produção por ser uma espécie perene. Muitos estudos vêm sendo desenvolvidos em todo o mundo buscando alternativas para o suprimento da demanda por biocombustíveis e uma delas consiste no desenvolvimento de variedades de oleaginosas com boas características fitossanitárias, agro-morfológicas e fitoquímicas, no entanto a espécie ainda se encontra em processo de domesticação, representando um grande desafio para os melhoristas. O seguinte estudo tem como objetivo a caracterização de acessos de pinhão manso da coleção de germoplasma da UFC, bem como analisar a diversidade genética entre esses acessos e suas progênies de meios-irmãos. Para isso realizaram-se análises de DNA utilizando marcadores moleculares ISSR. Através do índice de Jaccard, foram geradas matrizes de dissimilaridade genética, utilizadas na criação de dendrogramas e no agrupamento dos indivíduos. O agrupamento também foi realizado segundo o método de otimização de Tocher. As análises estatísticas foram realizadas através do programa GENES. Os acessos estudados apresentaram base genética estreita mas houve aumento significativo da variabilidade genética nas progênies de meios-irmãos, que poderão ser selecionadas para cruzamentos como fonte de variabilidade em programas de melhoramento genético.

Palavras-chave: *Jatropha curcas*. Marcadores moleculares. Diversidade genética.

ABSTRACT

Physic nut is a Euphorbiaceae with a wide distribution in the intertropical zones of the planet and which has been used for centuries for various purposes. More recently the jatropha oil was discovered as a good alternative to be explored as biodiesel source, because it presents valuable chemical and physical properties as well as good resistance to water deficit and low production cost estimates for being a perennial species. Many studies have been conducted around the world seeking alternatives to supply the demand for biofuels and one of them is the development of oilseed varieties with good phytosanitary, agro-morphological and phytochemicals features, but the species is still under domestication process, representing a great challenge for breeders. The following study aims the characterization of *Jatropha* accessions from the germplasm collection of the UFC and analyze the genetic diversity among these hits and their progenies of half-sib. To this were performed using DNA analysis ISSR molecular markers. Through Jaccard index, genetic dissimilarity matrices were generated, used in the creation of dendrograms and the grouping of individuals. The group was also performed according to the Tocher optimization method. Statistical analysis were performed using the GENES program. The studied accessions presented narrow genetic base, but there was significant increase in genetic variability in the progenies of half-sib, which may be selected for breeding as a source of variability in breeding programs.

Keywords: *Jatropha curcas*. Molecular markers. Genetic diversity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Perfil de amplificação do primer UBC-825 em 13 acessos de pinhão manso. ...	32
Figura 2 – Frequência das distâncias genéticas obtidas entre acessos da UFC e da UFV e seu número de repetição na matriz de dissimilaridade.....	35
Figura 3 – Dendrograma de dissimilaridade genética entre acessos da UFC e UFV, obtido pelo método UPGMA.....	37
Figura 4 – Frequência das distâncias genéticas obtidas entre genitores e progênies de meios-irmãos e seu número de repetição na matriz de dissimilaridade.....	40
Figura 5 – Dendrograma de dissimilaridade genética entre genitores e suas progênies, obtido pelo método UPGMA.....	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Identificação e origem dos materiais vegetais utilizados no estudo.....	26
Tabela 2 –	Iniciadores ISSR, sequência, número total de bandas, número de bandas polimórficas e porcentagem de polimorfismo gerados pela amplificação dos DNAs dos acessos estudados.	31
Tabela 3 –	Agrupamento dos acessos das coleções da UFC e da UFV pelo método UPGMA utilizando o coeficiente de Jaccard e o método de Tocher.....	33
Tabela 4 –	Separação dos pares de acessos das coleções de germoplasma com maior e menor similaridade e suas distâncias genéticas.....	34
Tabela 5 –	Coeficiente de correlação cofenética (CCC), estresse e distorção entre as matrizes de distância genética e a resultante do agrupamento dos acessos da UFC e da UFV.	35
Tabela 6 –	Agrupamento dos genitores e progênies pelo método de Tocher e pelo método UPGMA utilizando o coeficiente de Jaccard.	38
Tabela 7 –	Separação dos pares de acessos e progênies com maior e menor similaridade e suas distâncias genéticas.	39
Tabela 8 –	Coeficiente de correlação cofenética (CCC), estresse e distorção entre as matrizes de distância genética e a resultante do agrupamento dos genitores e suas progênies.	41

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1	Pinhão Manso (<i>Jatropha curcas</i> L.)	15
2.1.1	<i>Origem e Taxonomia</i>	15
2.1.2	<i>Descrição botânica e aspectos agronômicos</i>	16
2.1.3	<i>Importância</i>	17
2.2.	Diversidade genética em <i>Jatropha curcas</i>	20
2.2.1	<i>Uso de marcadores moleculares na avaliação da diversidade genética</i>	21
2.2.2	<i>Avaliação de progênes de meios-irmãos</i>	23
3	OBJETIVOS	25
3.1	Objetivo geral	25
3.2	Objetivos específicos	25
4	MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1	Isolamento do DNA genômico	27
4.2	Amplificação do DNA por marcadores ISSR	28
4.3	Análises estatísticas	29
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
5.1	Avaliação da diversidade genética entre acessos de pinhão manso das coleções da Universidade Federal do Ceará e da Universidade Federal de Viçosa	32
5.2	Avaliação da diversidade genética entre genitores e progênes de meios-irmãos	38
6	CONCLUSÕES	44
	REFERÊNCIAS	45
	APÊNDICE A – MATRIZ DE DISSIMILARIDADE OBTIDA PARA OS 10 GENITORES E AS 29 FAMÍLIAS DE MEIOS-IRMÃOS	50
	APÊNDICE B – MATRIZ DE DISSIMILARIDADE OBTIDA PARA OS 10 ACESSOS DA COLEÇÃO DE GERMOPLASMA DA UFC E OS 13 DA UFV	53

1 INTRODUÇÃO

O pinhão manso é um arbusto perene nativo provavelmente das Américas Central e do Sul. Membro da família Euphorbiaceae, se destaca pela rusticidade, adaptabilidade a regiões secas e, principalmente, pelas propriedades do óleo extraído de suas sementes, que pode ser utilizado na produção de biodiesel (HELLER, 1996).

Ultimamente a busca por espécies oleaginosas que produzam óleos não comestíveis tem se intensificado a fim de evitar a competição com a produção de alimentos. Nesse contexto de produção sustentável de biocombustíveis, de acordo com Marques & Ferrari (2008) uma alternativa para que esta demanda crescente seja suprida consiste no desenvolvimento de variedades produtivas, adaptadas e resistentes das espécies oleaginosas promissoras, como é o caso pinhão manso.

Embora a espécie tenha potencial de produção, existe falta de informação tecnológica, agrônômica e genética (SILVA, 2013). Além disso, estudos mais aprofundados devem ser realizados pelo fato da espécie ser perene, demandando muito rigor e precisão nos métodos de seleção, já que a utilização dos indivíduos ocorrerá por muitos anos (JUHÁSZ *et al.*, 2013).

Para iniciar um programa de melhoramento são necessárias fontes de variabilidade. Dessa forma, a criação de bancos de germoplasma é essencial para o processo, bem como a caracterização dos acessos coletados a fim de utilizá-los como base para a obtenção de indivíduos com potencial para o futuro desenvolvimento de cultivares com características desejáveis.

Famílias de meios-irmãos vêm sendo estudadas quanto a sua variabilidade genética por diversos pesquisadores e vêm se mostrando promissoras por apresentarem algumas vezes diversidade genética maior que seus genitores. (SPINELLI *et al.*, 2014; RABELO, 2010; LAVIOLA *et al.*, 2010)

A caracterização molecular é uma importante ferramenta a ser utilizada nesses estudos, pois permite de forma rápida a avaliação do genoma dos acessos selecionados. Segundo Cruz (2008) a partir de marcadores moleculares dominantes como os ISSR é possível estimar a dissimilaridade entre acessos. Para Juhász *et al.* (2013) medidas de dissimilaridade são de grande importância em estudos de divergência genética.

Para Cruz e colaboradores (2011) programas de pré-melhoramento de diversas culturas vêm sendo evidenciados como importantes estratégias para formação de materiais modernos, adaptados, resistentes e de melhor qualidade.

Assim, o presente trabalho teve como objetivo a caracterização molecular de acessos de pinhão manso da coleção de germoplasma da Universidade Federal de Viçosa e acessos da coleção da Universidade Federal do Ceará e suas famílias de meios-irmãos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Pinhão Manso (*Jatropha curcas* L.)

2.1.1 Origem e Taxonomia

O pinhão manso pertence à família Euphorbiaceae e é um arbusto perene, nativo provavelmente das Américas Central e do Sul (BASHA *et al.*, 2009). Ikbal *et al.* (2010) acreditam que a espécie teve origem também na África. O que a maioria dos pesquisadores concorda é que a América é um dos centros de origem, sendo que para Arruda *et al.* (2004) a origem mais provável é o Brasil e para Brittain & Lutaladio (2010), o centro de origem do pinhão manso é especificamente o México. Pelo fato da planta ser encontrada em todas as regiões intertropicais, essas informações são controversas (BELTRÃO *et al.*, 2006).

O nome *Jatropha* é derivado do grego *iatrós* e *trophé*, que significam “doutor” e “comida” respectivamente. Tais significados remetem suas propriedades medicinais (HELLER, 1996), enquanto *curcas* é o nome comum para o pinhão manso em Malabar, Índia, onde a cultura também é bastante disseminada. No Brasil, a planta apresenta muitos nomes populares que confirmam sua distribuição por grande parte do território do país, como purgueira, pinhão-de-purga, pinhão-do-Paraguai, grão-de-maluco, turba, tartago, tapete, siclité, figo-do-inferno, pinhão-das-barbadas, medicineira e pinhão-de-cerca, dentre outros (ARRUDA *et al.*, 2004). Os dois últimos remetem às suas principais utilizações, como planta medicinal e como cerca-viva.

Tradicionalmente, sementes de pinhão manso e outras partes da planta foram utilizadas para produção de óleo, sabão e medicamentos diversos (KOHLI *et al.*, 2009), assim, a planta foi introduzida por navegadores portugueses, no fim do século XVIII, no arquipélago do Cabo Verde e em Guiné, de onde mais tarde provavelmente foi disseminado pelo continente africano (HELLER, 1996).

Segundo Burkill (1966) também foram os portugueses os responsáveis por levar o pinhão manso à Ásia. Sua vasta distribuição geográfica é explicada por sua rusticidade e resistência a longas estiagens, sendo adaptável a condições edafoclimáticas muito variáveis (ARRUDA *et al.*, 2004).

2.1.2 Descrição botânica e aspectos agronômicos

O pinhão manso é um arbusto de grande porte, cuja altura normal está entre dois a três metros, podendo atingir valores ainda maiores. Por apresentar muitas vezes alturas superiores a essas, ele também pode ser considerado uma árvore de pequeno porte (HELLER, 1996).

A planta segue a arquitetura clássica das euforbiáceas, onde a primeira inflorescência é apical, originando a emissão de novos ramos que passam a ser axilares até o surgimento de novas inflorescências que, por sua vez, impedem novamente o crescimento apical, surgindo os próximos ramos e, assim, sucessivamente (ALBUQUERQUE *et al.*, 2008).

A inflorescência é do tipo panícula em cimeira definida, isto é, apresenta um eixo principal com eixos secundários, formando flores pedunculadas. As flores femininas ocorrem em menor número (aproximadamente 10 a 20 % da panícula) se comparadas às flores masculinas; estão dispostas no ápice do estame principal e nas ramificações. Ocasionalmente podem ocorrer flores hermafroditas. O pinhão manso apresenta polinização cruzada, primordialmente entomófila, entre diferentes flores da mesma planta ou de plantas diferentes, sendo parcialmente auto-compatível (ALBUQUERQUE *et al.*, 2008). De acordo com Saturnino *et al.* (2005) a deiscência da antera ocorre uma hora após a abertura da flor e os estigmas tornam-se receptíveis após a abertura da flor, assim permanecendo por três dias.

As folhas são alternadas a sub-opostas, com filotaxia em espiral. Quando jovens, apresentam coloração vermelho-vinho, a qual vai se perdendo conforme se expandem, tornando-se verdes e brilhantes (PEIXOTO, 1973).

Devido à emissão sequencial de inflorescências, a formação dos frutos não ocorre ao mesmo tempo e numa mesma planta são observados frutos com diferentes idades e estádios de maturação. A desuniformidade no processo de formação e maturação dos frutos força o produtor a fazer a colheita de forma escalonada, o que requer tempo e mão-de-obra, tornando esse processo uma das fases mais críticas, onerando o sistema de produção (ALBUQUERQUE *et al.*, 2008).

O fruto do pinhão manso é seco, liso, com quase sempre três cocas globosas. É coriáceo, capsular, ligeiramente roliço, com ápice e base agudas. Quando seco, apresenta deiscência, fazendo com que as cocas se fendam longitudinalmente, expondo as sementes. Sua coloração varia de verde-cana a amarelo e, finalmente, marrom-escuro, quando maduro. As sementes possuem forma ovalada, envoltório liso, coloração preta, marcada por suaves estrias (NUNES *et al.*, 2009).

A cultura do pinhão manso é propagada principalmente por sementes e por estaquia. Até o momento, não se registrou nenhum caso de sementes de pinhão manso apresentando dormência. No entanto, segundo Albuquerque *et al.* (2008) dependendo das condições edafoclimáticas da área e da viabilidade da semente, esta poderá demorar até 30 dias para emergir.

A espécie apresenta caule com diâmetro médio de 25 cm, de coloração cinza esverdeada e com numerosas cicatrizes produzidas pela queda das folhas (TOMINAGA *et al.*, 2007). No Brasil, Araújo & Ribeiro (2008) observaram que a queda foliar ocorre ao longo de todo o ano, sendo mais intensa no período seco.

O pinhão manso é exigente em insolação e bastante resistente à seca, mas pode crescer sob uma ampla gama de regimes de chuva (200 a 1500 mm/ano), também sobrevivendo em terras marginais com condições climáticas adversas (BASHA *et al.*, 2009). Ele se desenvolve em diversos tipos de solos, inclusive com declividades elevadas, mas não tolera regiões alagadas ou impermeáveis (YE *et al.*, 2009). De acordo com Saturnino *et al.* (2005) embora as plantas suportem veranicos e baixa fertilidade do solo, isso reflete em uma pequena queda no rendimento da cultura e na diminuição do teor calorífero do óleo.

2.1.3 Importância

A planta de pinhão manso possui inúmeras utilidades. Praticamente todas as suas partes podem ser usadas pelo homem, de forma direta ou indireta. Nos trópicos, o pinhão manso é cultivado amplamente como cerca-viva em campos e pastagens, se tornando componente obrigatório das paisagens de diversas regiões de El Salvador e Mali, além de ser uma das principais árvores plantadas da Alta Guiné. A utilização em cercas-vivas se deve à fácil propagação por estacas, que se desenvolvem mesmo em plantios muito adensados, além da vantagem de não serem consumidas pelo gado (HELLER, 1996).

A queda das folhas nos períodos de estiagem auxilia na conservação do solo, pois a camada de matéria seca depositada reduz a erosão, evita a perda de água por evaporação, evita enxurradas e enriquece o solo (PEIXOTO, 1973). Segundo Severino *et al.* (2006) o plantio de pinhão manso na Índia está sendo feito exclusivamente em terras marginais, o que inclui áreas degradadas, relevo acidentado, áreas salinizadas, margens de rodovias e ferrovias etc. Tal fato é explicado pela necessidade de serem utilizadas as melhores terras para produção de alimentos e assim, a boa tolerância a diversos fatores bióticos e abióticos e a ampla adaptação faz com

que a cultura não venha a competir diretamente com a produção de alimentos, não ameaçando a segurança alimentar.

Para fins medicinais, a seiva que flui a partir do tronco é usada para prender hemorragia de feridas e aliviar dores, como as causadas por reumatismo (HELLER, 1996). O látex da planta também é usado como cicatrizante e purgante, as raízes são consideradas diuréticas e as folhas são utilizadas para combater doenças de pele (ARRUDA *et al.*, 2004).

Alguns autores citam a possibilidade de consumo de folhas jovens por humanos quando cozidas ao vapor, mas tal fato só ocorre no México, onde de acordo com Heller (1996), as plantas apresentam menor toxidez.

Na alimentação animal, o farelo de pinhão manso pode ser utilizado como ingrediente de ração, apresentando alto teor de potássio, fósforo e cálcio, e baixo teor de contaminantes inorgânicos (CASARINI; FERRARI; MARQUES, 2009). A torta resultante da extração do óleo das sementes de pinhão manso constitui excelente adubo orgânico e, segundo Mendonça & Laviola (2009), poderia ser utilizada como suplemento proteico altamente nutritivo na ração de ruminantes de pequeno e grande porte, o que vem sendo impossibilitado devido à presença de fatores limitantes tóxicos, alergênicos e antinutricionais. A Embrapa Agroenergia vem desenvolvendo estratégias para solucionar esse problema, sendo uma delas a identificação de materiais genéticos cujos grãos não apresentem toxidez para a posterior tentativa de incorporação desta característica a variedades comerciais que venham a ser lançadas.

Diversos trabalhos demonstram ser possível o uso do pinhão manso em consórcios com culturas como feijão, amendoim, girassol, milho e muitas espécies forrageiras, gerando também a possibilidade de integração da cultura com a pecuária (SILVA *et al.*, 2012; SOUZA *et al.*, 2012; ARRUDA *et al.*, 2004). Muitas vezes a planta cria um microclima benéfico a outras espécies, favorecendo seu desenvolvimento.

O óleo de pinhão manso é uma boa alternativa para ser explorado como uma fonte para a produção de biodiesel, pois apresenta propriedades valiosas, tais como: baixa acidez e boa estabilidade quando comparado com o óleo de soja, que é o mais utilizado até então. Além disso, possui viscosidade mais baixa que o óleo de rícino e melhores propriedades a frio que o óleo de palma. Ele também tem um maior número de cetano em comparação ao diesel, tornando-o uma boa alternativa de combustível sem modificações necessárias ao motor (JAIN & SHARMA, 2010; TAPANES *et al.*, 2008).

Analisando as características físico-químicas do óleo de pinhão manso é possível perceber uma diferença marcante entre ele e outros óleos vegetais, como o de macaúba e o de

dendê, pois estes apresentam ponto de solidificação em torno de 15 °C, enquanto que o do pinhão manso é inferior a -10 °C. Este aspecto pode favorecer o emprego direto do óleo de pinhão manso puro ou em mistura com diesel, nos motores de combustão interna, mesmo nas regiões de clima temperado (MELLO *et al.*, 2009).

Em uma análise comparativa da aplicação direta do óleo de pinhão manso com o óleo diesel de origem fóssil, observou-se que o consumo de óleo de pinhão manso foi 20% maior que o diesel em um motor comercial de combustão interna, porém o ruído do motor foi mais suave e a emissão de fumaça 40 % menor, contribuindo para a diminuição das poluições sonoras e do meio ambiente (SILVA, 2006).

De acordo com Marques & Ferrari (2008) observando por uma ótica de sistema de produção sustentável de biocombustíveis, é previsto um aumento extraordinário da demanda de oleaginosas no Brasil e no mundo, principalmente tendo em vista a obrigatoriedade da mistura de porcentagens cada vez maiores de biodiesel ao diesel de petróleo. Assim, uma alternativa para que esta demanda seja suprida, consiste no desenvolvimento de variedades que além de apresentarem excepcionais características fitossanitárias e agro-morfológicas, apresentem também boas características fitoquímicas.

Dois obstáculos para a implantação do cultivo comercial da cultura surgem nesse sentido, que são a domesticação da espécie e a criação de um programa de melhoramento genético que resulte em uma cultivar com características agronômicas superiores (BRASIL, 2008). Na busca por solucionar esses problemas, a Embrapa vem caracterizando e enriquecendo uma coleção de germoplasma de pinhão-manso, com acessos originários de diversas regiões do Brasil e do exterior. A empresa também desenvolve ações que visam à caracterização botânica e molecular de futuros cultivares de pinhão-manso. Segundo Durães *et al.* (2009) a coleção após ser caracterizada servirá de base para os programas de melhoramento genético da cultura.

De acordo com a Embrapa (2013), ainda se estimam mais alguns anos para o lançamento de cultivares melhoradas, bem como de informações sobre os sistemas de produção da cultura para as diferentes regiões do Brasil. No entanto, a empresa ressalta que já houve a obtenção de resultados importantes como a constituição de um banco ativo de germoplasma, conhecimentos sobre espaçamento de plantas, sistema de poda, produção de sementes, consórcio com outras culturas e fabricação de biodiesel a partir do óleo, além da identificação das principais pragas e doenças da cultura. Para esse último, buscaram-se estratégias de redução dos custos de controle como a introdução de genótipos de outros países e a avaliação de produtos fitossanitários.

2.2. Diversidade genética em *Jatropha curcas*

Para Marques & Ferrari (2008) o sucesso de um programa de melhoramento genético de pinhão manso depende da obtenção de uma variabilidade genética adequada e da avaliação dos acessos divergentes com características desejáveis tais como: alta produtividade de sementes; alta taxa de flor feminina em relação à flor masculina, porte reduzido, resistência a pragas e doenças, uniformidade e precocidade de maturação, resistência/tolerância à seca, e, principalmente, alto teor e melhoramento das propriedades químicas e físicas do óleo.

Atualmente, ainda não se tem informações suficientes que comprovem a existência de variabilidade genética suficiente para a realização de um programa de melhoramento eficiente de pinhão manso. Embora a espécie possua polinização cruzada, o que segundo Marques (2007) proporciona alta variabilidade genética, permitindo ao melhoramento genético selecionar caracteres de interesse agrônomo. Estudos desenvolvidos por Silva (2008) usando o coeficiente de Jaccard e marcadores moleculares tipo AFLP em genótipos coletados em Minas Gerais e Sergipe mostraram níveis baixos de polimorfismo, ou seja, plantas com pouca variabilidade genética.

A diversidade genética em um grupo de genitores é de grande importância em um programa de melhoramento, uma vez que possibilita identificar combinações híbridas que possuam maior efeito heterótico (RABELO, 2010). Portanto, é muito importante o levantamento de informações quanto à diversidade do germoplasma disponível para o estabelecimento de coleções com variação genética representativa da espécie, bem como de informações acerca da transferência dessa variação às próximas gerações.

O banco de germoplasma é o local onde uma amostra de variabilidade genética de determinada espécie é conservada em condições artificiais e podem ser preservadas por décadas, podendo ser usadas para a propagação da espécie ou para pesquisas posteriores (BORÉM & MIRANDA, 2005).

Laviola *et al.* (2011) constataram a existência de variabilidade genética e identificaram acessos de pinhão-manso com ausência de ésteres de forbol nos grãos, que podem ser utilizados como fonte de variabilidade genética para o desenvolvimento de cultivares comerciais não tóxicas. Em estudo realizado por Kaushik *et al.* (2007) com acessos coletados de diferentes zonas agro-climáticas na Índia, constatou-se variabilidade para caracteres como tamanho, teor de óleo e massa de sementes, assim os autores sugeriram que cruzamentos entre acessos possivelmente resultarão em ampla variabilidade nas gerações subsequentes. Essas

variações poderão ser mais facilmente visualizadas e estudadas através do uso de marcadores moleculares.

2.2.1 Uso de marcadores moleculares na avaliação da diversidade genética

Segundo Milach (1998), os marcadores são características de DNA que diferenciam dois ou mais indivíduos e são herdados geneticamente. Já Ferreira & Grattapaglia (1998) definem como marcador molecular qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso.

O desenvolvimento de novas tecnologias no campo da biologia molecular, especialmente o da PCR (reação em cadeia da polimerase) permitiu a popularização de métodos moleculares em diversas áreas de conhecimento biológico (CRUZ *et al.*, 2011). Para Silva (2013) isso se deve principalmente pela possibilidade de se gerar grandes quantidades de segmentos específicos do genoma.

Para Xavier *et al.* (2005) uma das principais vantagens da utilização da PCR é propiciar a redução do tempo para identificação da diversidade genética entre os genótipos avaliados. Características como facilidade, rapidez, versatilidade e sensibilidade da PCR, vêm tornando essa técnica particularmente poderosa para estudos genético-moleculares (SILVA, 2013).

O sucesso de um programa de melhoramento genético depende fundamentalmente de algumas etapas, as quais podem ser auxiliadas e aceleradas por meio da utilização mais efetiva dos marcadores moleculares. A sua utilização na obtenção de perfis genéticos fornece uma elevada precisão na caracterização da diversidade genética dentro de germoplasma, uma vez que acessam a variabilidade diretamente ao nível do DNA (GUIMARÃES, 2004). Os marcadores de DNA apresentam vantagens em relação aos marcadores isoenzimáticos, uma vez que podem ser obtidos em grande número sem sofrer influência do ambiente (BORÉM, 1998).

Diversos estudos de diversidade genética vêm sendo realizados em pinhão manso e nestes os marcadores moleculares RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) e ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*) são talvez os mais utilizados (OVANDO-MEDINA *et al.*, 2011). Segundo Almeida *et al.* (2009) muitos trabalhos apresentam alto conteúdo de informação genética desvendado por marcadores ISSR, que aparentemente são apropriados para estudos filogenéticos, de avaliação da diversidade genética e identificação de cultivares. Esses marcadores são altamente polimórficos em populações de plantas, o que proporciona uma genotipagem consistente e confiável (WANG *et al.*, 2009).

Kafkas *et al.* (2006), estudando diversidade genética em pistache e comparando marcadores ISSR e RAPD, observaram que o segundo apresenta problemas de confiabilidade e reprodutibilidade entre laboratórios, o que limita sua utilização. Além disso, o autor menciona que o uso de marcadores ISSR é preferível pelo menor investimento financeiro exigido.

Ao trabalhar com café e espécies do gênero *Psilanthus*, ambos pertencentes à família Rubiaceae, Kumar *et al.* (2008) observou um maior número de fragmentos amplificados por iniciador nos marcadores ISSR quando comparados aos RAPD.

Em *Jatropha curcas* L., ao comparar o uso de marcadores ISSR e RAPD, Gupta *et al.* (2008) verificaram eficiência em ambos devido suas capacidades de revelar várias bandas informativas em uma única amplificação. No entanto, os marcadores ISSR apresentaram maior poder de resolução, média de número de bandas por primer, heterozigosidade média, heterozigosidade total e fluxo gênico.

Kumar, Parthiban e Rao (2009), estudando diversidade genética de oito espécies do gênero *Jatropha* e três genótipos de *Jatropha curcas*, utilizaram nove iniciadores ISSR e obtiveram 98,14% de polimorfismo entre as espécies. Seis dos iniciadores apresentaram potencial inclusive para identificar uma espécie de *Jatropha* a partir de uma população mista composta por genótipos do mesmo gênero.

A partir de marcadores moleculares dominantes como os ISSR é possível estimar a dissimilaridade entre acessos, utilizando o complemento de coeficientes de similaridade (CRUZ, 2008). Medidas de dissimilaridade são de grande importância em estudos de divergência genética em que se procura identificar genitores a serem utilizados em programas de hibridação (JUHÁSZ *et al.*, 2013).

O coeficiente de Jaccard é um coeficiente de dissimilaridade muito utilizado, pois possibilita evidenciar diferenças intraespecíficas e desconsidera a ausência de bandas como sinônimo de similaridade genética (PAZETO, 2013). Com os dados de dissimilaridades obtidos através desse coeficiente, é possível utilizar técnicas de agrupamento para reunir acessos que apresentam dissimilaridade. Dentre estas técnicas pode-se destacar a da Ligação Média Não Ponderada Entre Grupos – UPGMA e o Método de Tocher. Segundo Silva (2013) o primeiro é comumente utilizado em estudos de divergência genética, mas para Cruz *et al.* (2011) esse tipo de método aplica-se nesse caso para gerar dendrogramas, não sendo o mais indicado para a divisão em grupos. No segundo método, por ser considerado de otimização, os grupos são formados por adequação de um critério de agrupamento, se tornando mais precisos e, assim, sendo muito aplicado no melhoramento genético com essa finalidade.

Tanto a representação gráfica das medidas de dissimilaridade (dendrograma) quanto o agrupamento dos materiais analisados em trabalhos de diversidade genética são de grande importância nesses estudos, atuando inclusive de forma complementar. Para Cruz *et al.* (2011), estes possibilitam a identificação de genitores adequados à obtenção de híbridos com maior efeito heterótico, selecionando cruzamentos com maiores chances de sucesso. Os autores ainda citam que programas de pré-melhoramento de diversas culturas vêm sendo evidenciados como importantes estratégias para formação de materiais modernos, adaptados, resistentes e de melhor qualidade.

2.2.2 Avaliação de progênies de meios-irmãos

Segundo Spinelli *et al.* (2014) a existência de variabilidade genética é uma condição básica para a obtenção de ganhos de seleção. Durães *et al.* (2009) afirma que a espécie *Jatropha curcas* apresenta base genética estreita, assim, se torna necessária a busca por acessos mais divergentes.

Nesse sentido, principalmente por ser uma planta alógama, surge a possibilidade de obtenção de maiores variações genéticas em populações de pinhão manso já estabelecidas, a partir do uso de meios-irmãos. Esses acessos são obtidos através da coleta de sementes de plantas-mãe conhecidas, mas que, por apresentarem polinização cruzada, não se tem conhecimento do doador de pólen.

Com a alogamia existe uma tendência a maiores índices de heterozigosidade, o que contribui com o aumento da diversidade genética e da heterogeneidade da população com o passar do tempo. Esse fato gera a possibilidade de seleção pelo melhorista de materiais divergentes que podem ser usados em cruzamentos.

Avaliando progênies de meios-irmãos quanto a produtividade de sementes por três safras, Spinelli *et al.* (2014) verificaram, através de estimativas de estabilidade e adaptabilidade temporal da produção, uma tendência de manutenção da superioridade das plantas ao longo dos anos, e selecionou algumas famílias de meios-irmãos como estáveis e produtivas. Além disso, houve significância para a variabilidade da produção de sementes entre as famílias, o que segundo o autor mostra a possibilidade de ganhos por seleção.

Trabalhando com 18 famílias de meios irmãos, Rocha *et al.* (2014) verificaram interação significativa entre genótipo e ambiente quanto à produção de grãos, indicando a

existência de variabilidade genética entre as famílias, possibilitando seleções dos melhores genótipos para uso em programas de melhoramento.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Caracterizar acessos de pinhão manso da coleção de germoplasma da UFC a nível molecular com o uso de marcadores ISSR.

3.2 Objetivos específicos

- a) Analisar a diversidade genética entre acessos de pinhão manso da coleção de germoplasma de *J. curcas* da Universidade Federal do Ceará.
- b) Analisar a diversidade genética entre famílias de meios-irmãos de pinhão manso da coleção de germoplasma de *J. curcas* da Universidade Federal do Ceará e a relação genética com seus genitores.

4 MATERIAL E MÉTODOS

As análises foram realizadas no Laboratório de Biotecnologia e Melhoramento Vegetal da Universidade Federal do Ceará (UFC).

Na avaliação da diversidade genética dos acessos de pinhão manso, realizou-se a análise do DNA a fim de caracterizar os materiais através da utilização de marcadores moleculares ISSR.

A caracterização molecular foi realizada em duas etapas: na primeira foram utilizados dez acessos provenientes da coleção de germoplasma da UFC (genitores) e 13 acessos provenientes da coleção de germoplasma de pinhão manso da Universidade Federal de Viçosa (UFV) e na segunda dez acessos (genitores) e suas progênes de meios-irmãos, todos apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Identificação e origem dos materiais vegetais utilizados no estudo.

	Tratamento	Identificação	Origem
Genitores	P1	JCCE 034	Crateús – CE
	P2	JCCE 035	Crateús – CE
	P3	JCCE 038	Crateús – CE
	P4	JCCE 064	Parambu – CE
	P5	JCCE 053	Parambu – CE
	P6	JCCE 055	Parambu – CE
	P7	JCCE 014	Quixadá – CE
	P8	UFRRJFMI 002	Rio de Janeiro
	P9	UFRRJFMI 346	Rio de Janeiro
	P10	UFRRJFMI 874	Rio de Janeiro
Meios-Irmãos	1	9-B3-L2	Pentecoste – CE
	2	9-B3-L1	Pentecoste – CE
	3	5-B2-L4	Pentecoste – CE
	4	4-B3-L3	Pentecoste – CE
	5	1-B1-L4	Pentecoste – CE
	6	1-B1-L3	Pentecoste – CE
	7	10-B1-L1	Pentecoste – CE
	8	8-B1-L3	Pentecoste – CE
	9	6-B3-L3	Pentecoste – CE
	10	6-B3-L4	Pentecoste – CE
	11	1-B3-L4	Pentecoste – CE
	12	10-B3-L1	Pentecoste – CE
	13	3-B3-L4	Pentecoste – CE
	14	3-B1-L4	Pentecoste – CE
	15	2-B2-L6	Pentecoste – CE
	16	2-B1-L3	Pentecoste – CE
	17	3-B2-L1	Pentecoste – CE

continua

	Tratamento	Identificação	conclusão Origem
Meios-Irmãos	18	8-B2-L7	Pentecoste – CE
	19	8-B3-L1	Pentecoste – CE
	20	6-B2-L8	Pentecoste – CE
	21	5-B3-L1	Pentecoste – CE
	22	5-B1-L3	Pentecoste – CE
	23	4-B2-L6	Pentecoste – CE
	24	4-B2-L5	Pentecoste – CE
	25	7-B1-L3	Pentecoste – CE
	26	7-B2-L8	Pentecoste – CE
	27	2-B3-L2	Pentecoste – CE
	28	9-B2-L6	Pentecoste – CE
	29	10-B2-L8	Pentecoste – CE
Acessos da coleção de germoplasma da UFV	M1	UFVJC 10	João Pinheiro – MG
	M2	UFVJC 15	Veredas – MG
	M3	UFVJC 18	Montalvânia – MG
	M4	UFVJC 23	Caratinga – MG
	M5	UFVJC 26	Arinos – MG
	M6	UFVJC 40	Formoso – TO
	M7	UFVJC 41	Jales – SP
	M8	UFVJC 44	São Carlos – SP
	M9	UFVJC 45	Barra dos Bugres – MT
	M10	UFVJC 65	Desconhecido
	M11	UFVJC 69	Santa Bárbara do Tugurio – MG
	M12	UFVJC 70	Arquimedes – RO
	M13	UFVJC 85	Serranópolis – GO

4.1 Isolamento do DNA genômico

Para as avaliações moleculares realizou-se a extração do DNA genômico dos acessos de pinhão manso selecionados para o estudo.

Foram coletadas folhas jovens dos dez acessos de pinhão manso mais produtivos e de menor estatura, oriundos da coleção de germoplasma de pinhão manso da Universidade Federal do Ceará, avaliados por Silva (2013). Estes corresponderam aos dez genitores utilizados no trabalho. Em casa de vegetação, realizou-se o plantio de sementes das progênies de meios-irmãos desses acessos, sendo três meios-irmãos para cada genitor, com exceção do material 28, com dois meios-irmãos, totalizando vinte e nove progênies de meios-irmãos. Também foram semeados catorze materiais provenientes da coleção de germoplasma de pinhão manso da Universidade Federal de Viçosa. Após a germinação e condução das plantas, foram coletadas folhas jovens de todos os materiais.

Após a coleta do material vegetal, realizou-se a extração do DNA genômico de acordo com o protocolo de Doyle & Doyle (1990) com uma modificação, que constou de tratamento com RNase somente após a extração completa do DNA.

Assim, preparou-se o tampão de extração com os seguintes componentes e suas respectivas concentrações: Tris pH 8,0 (100 mM); NaCl (1,4 M); EDTA (20mM); CTAB 2 % (p/v); PVP 2 %; e 0,2 % de β -mercaptoetanol. O tampão foi levado ao banho-maria a 65 °C e pesaram-se 300 mg de folhas de cada tratamento, que em seguida foram acondicionadas em tubos eppendorff identificados. Adicionou-se 300 μ L do tampão em cada tubo e foi realizada a maceração dos tecidos foliares com auxílio de bastão de vidro. Depois adicionou-se mais 400 μ L do tampão em cada tubo, homogeneizou-se as amostras e estas foram incubadas em banho-maria a 65 °C por aproximadamente 30 minutos. Após completado esse período, a cada tubo foram adicionados 700 μ L de clorofórmio:álcool isoamílico na proporção 24:1 e em seguida estes foram centrifugados a 12300 G por 10 minutos. Após a centrifugação foi possível observar a separação de duas fases nas amostras e a fase superior foi transferida a novos tubos marcados, adicionadas de igual volume de isopropanol gelado para a precipitação dos ácidos nucleicos (aproximadamente 400 μ L). Os tubos foram invertidos suavemente por algumas vezes e incubados no freezer por aproximadamente 14 horas. Após esse período, as amostras foram levadas à centrífuga por 10 minutos a 12300 G e o sobrenadante foi descartado. Ao precipitado adicionou-se 500 μ L de etanol 70 % e o material foi levado novamente à centrífuga por 5 minutos a 12300 G. O excesso de etanol foi removido com auxílio de pipetas e esperou-se a evaporação completa do álcool (cerca de 2 horas). O DNA foi então ressuspendido em 100 μ L de água ultra pura e partiu-se para a etapa de hidrólise de RNA, adicionando-se 16 μ L de RNase (40 ng/ μ L) em cada tudo e levando essas a banho-maria a 37 °C por 30 minutos. Logo após as amostras foram armazenadas a -20 °C.

Foi realizado o teste de qualidade dos DNAs extraídos através de corrida em gel de agarose 0,8 %, verificando-se a presença de bandas e a retenção de material nos poços dos géis ou ainda arraste dos materiais. Nos casos de bandas nítidas, os materiais foram quantificados em espectrofotômetro NanoDrop 2000. Os materiais que não apresentaram qualidade no teste foram extraídos novamente até a obtenção da qualidade desejada.

4.2 Amplificação do DNA por marcadores ISSR

Nas análises ISSR utilizaram-se 23 iniciadores.

Os DNAs extraídos foram diluídos em água ultra pura para a concentração de 10 ng/μl e a partir das soluções diluídas realizaram-se as reações de PCR.

Em microtubos eppendorff foram adicionados os seguintes componentes, com suas respectivas concentrações finais: tampão (1X), dNTPs (0,2 mM), MgCl₂ (2mM), iniciador (0,8 μM), DNA genômico (30 ng/μl) e Taq DNA polimerase (1 unidade). O programa do termociclador constou de uma desnaturação inicial de 94 °C por 5 minutos e 40 ciclos de desnaturação, anelamento e extensão. Cada ciclo consistiu de 94 °C por 1 minuto, 50, 53 ou 55 °C por 30 segundos e 72 °C por 1 minuto. Houve ainda uma extensão final de 72 °C por 10 minutos e redução para 4 °C. As variações de temperatura na fase de anelamento ocorreram de acordo com a melhor amplificação para cada um dos iniciadores. As reações de PCR foram realizadas em termociclador Axygen modelo THERM-1000.

Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2%, preparado com tampão TBE com concentração final 0,5X. As eletroforeses foram realizadas a 80 Volts em cuba horizontal e o tempo médio de corrida foi de 1 hora e meia. Os géis foram corados com brometo de etídio (10mg/mL) e suas imagens capturadas em fotodocumentador.

4.3 Análises estatísticas

Foram analisadas as fotos dos géis das eletroforeses de forma a gerar uma planilha binária em que o número 1 foi utilizado para representar a presença de bandas e o 0 a ausência. Foram criadas planilhas para todos os materiais analisados e para cada iniciador que conferiu amplificação. Com os dados das planilhas, recorreu-se ao software GENES (CRUZ, 2008) para a realização das análises estatísticas. Foi calculada então a matriz de dissimilaridade genética, utilizando o complemento do índice de similaridade de Jaccard (1901):

$$D_{ij} = 1 - \frac{a}{a + b + c}$$

Em que:

a: presença de bandas nos indivíduos i e j;

b: presença de bandas no indivíduo i e ausência no indivíduo j;

c: ausência de banda no indivíduo i e presença no indivíduo j;

A partir da matriz de dissimilaridade gerada pelo índice de Jaccard, foi construído um dendrograma utilizando o algoritmo UPGMA, que representa a ligação média entre grupos. Também foi calculado o coeficiente de correlação cofenético (r) e o ponto de corte foi definido com base na estimativa da dissimilaridade genética média (Dgm):

$$D_{gm} = \frac{\sum D_{gij}}{N}$$

Em que:

D_{gij}: dissimilaridade genética entre os indivíduos *i* e *j*;

N: número de pares obtidos.

Foi realizado o agrupamento segundo o método de Tocher, permitindo o estabelecimento de grupos onde existe homogeneidade entre seus membros e heterogeneidade entre membros de grupos distintos. Calculou-se a heterozigose média para os locus avaliados das plantas-mãe e para as famílias de meios-irmãos.

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o aplicativo GENES (CRUZ, 2008).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na avaliação dos materiais vegetais quanto à variabilidade alélica observou-se amplificação de 12 iniciadores dos 23 testados, sendo 9 polimórficos. Os iniciadores amplificaram 44 bandas, observando-se 59,08 % de polimorfismo, conforme mostra a Tabela 2.

Ao avaliar relações genéticas em germoplasma de *Jatropha curcas* utilizando iniciadores ISSR, Basha *et al.* (2009) obtiveram 35,49 % de polimorfismo, enquanto Gomes (2013) obteve 95,76 %. Rosado *et al.* (2009), ao avaliar a diversidade genética de acessos de pinhão manso, obtiveram apenas 6,2 % de polimorfismo ao utilizar marcadores RAPD e pesquisadores como Gupta *et al.* (2008) encontraram altos valores na utilização tanto de marcadores RAPD como ISSR, com 84,26 % e 76,54 % de polimorfismo respectivamente, o que mostra grandes variações nos resultados dos estudos.

Essas variações podem ocorrer devido aos materiais vegetais utilizados serem diferentes em cada pesquisa. Enquanto Basha *et al.* (2009) utilizaram materiais com origem em 13 países, Gomes (2013) avaliou acessos provenientes das regiões nordeste e sudeste do Brasil. Rosado *et al.* (2009) também avaliou apenas acessos com origem no Brasil, enquanto Gupta *et al.* (2008) avaliou acessos coletados em diferentes regiões da Índia. Dentre essas avaliações, pode-se observar que o maior valor de polimorfismo foi encontrado em acessos provenientes principalmente da região nordeste do Brasil.

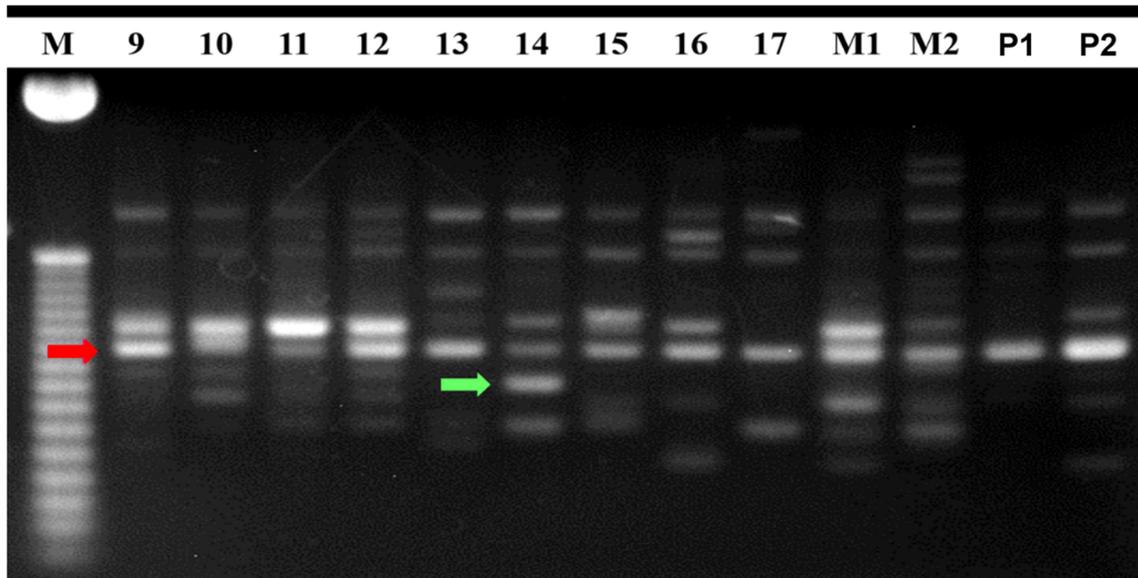
Tabela 2 – Iniciadores ISSR, sequência, número total de bandas, número de bandas polimórficas e porcentagem de polimorfismo gerados pela amplificação dos DNAs dos acessos estudados.

Iniciador	Sequência 5'-3'	Total de bandas	Nº de bandas polimórficas	% de polimorfismo
I-810	(GA) ₈ T	1	1	100,0
I-812	(GA) ₈ A	7	0	0,0
I-825	(AC) ₈ AT	3	2	66,66
I-827	(AC) ₈ G	3	3	100,0
I-841	(GA) ₈ YC	2	0	0,0
I-842	(GA) ₈ YG	5	0	0,0
I-888	BDB(CA) ₈	2	2	100,0
UBC-811	(GA) ₈ C	2	2	100,0
UBC-825	(AC) ₈ T	11	8	72,72
UBC-827	(CA) ₈ G	2	2	100,0
UBC-873	(GACA) ₄	4	4	100,0
UBC-880	GGA(GAG) ₂ AGGAGA	2	2	100,0
TOTAL		44	26	59,08

A porcentagem de iniciadores que amplificaram foi de 52,17 % e valores semelhantes foram obtidos por pesquisadores trabalhando com germoplasma de pinhão manso ao utilizarem marcadores ISSR, como Basha *et al.* (2009) com 48% e Singh *et al.* (2010) com 56 %.

Na Figura 1 pode-se observar o perfil de amplificação de um dos iniciadores ISSR, onde as setas vermelha e verde indicam bandas monomórficas e polimórficas, respectivamente. Nesta figura os acessos 9 a 17 são progênie de meios-irmãos, os acessos M1 e M2 são materiais da coleção de germoplasma da Universidade Federal de Viçosa e os acessos P1 e P2 são genitores da coleção de germoplasma da Universidade Federal do Ceará. O marcador utilizado foi o de 50 pares de bases.

Figura 1 – Perfil de amplificação do primer UBC-825 em 13 acessos de pinhão manso.



5.1 Avaliação da diversidade genética entre acessos de pinhão manso das coleções da Universidade Federal do Ceará e da Universidade Federal de Viçosa

A existência de variabilidade genética é uma condição básica para a obtenção de ganhos de seleção (SPINELLI *et al.*, 2014). Existe assim uma necessidade por acessos mais divergentes para a cultura, sejam estes obtidos por cruzamentos, por transformação gênica ou mesmo coletados de regiões onde a espécie apresenta maior variabilidade.

Os bancos de germoplasma de pinhão manso possuem assim um papel fundamental no desenvolvimento de programas de melhoramento da espécie, fornecendo a base para a realização destes, o que justifica sua criação, manutenção e caracterização.

Os grupos formados utilizando os métodos UPGMA e Tocher estão apresentados na Tabela 3. Verifica-se que na maioria dos grupos formados pelos dois métodos estão presentes indivíduos das duas coleções, indicando pouca variabilidade entre as coleções avaliadas.

Tabela 3 – Agrupamento dos acessos das coleções da UFC e da UFV pelo método UPGMA utilizando o coeficiente de Jaccard e o método de Tocher.

Grupo	Tocher	UPGMA
I	P2, P4, P5, P6, P7, P8, P9, P10, M1, M2, M3, M4, M7, M9, M10, M11, M12, M13	P2, P4, P5, P8, P10, M2, M3, M4, M7, M9, M10, M11, M12
II	P1, P3, M6, M8	P3, M1
III	M5	M5, M13
IV		M6
V		P1, P9, M8
VI		P6
VII		P7

O método de Tocher gerou 3 grupos, sendo os grupos I e II formados por acessos da coleção de germoplasma da UFC e da UFV. O fato de estarem presentes no mesmo grupo acessos de origens diferentes representa menor diversidade genética encontrada entre eles. O grupo III é formado por apenas um acesso proveniente da coleção da UFV. Esse material foi coletado em Minas Gerais e apresentou distância genética superior a encontrada entre todos os membros dos demais grupos, podendo ser utilizado em cruzamentos a fim de aumentar a diversidade entre os demais acessos.

Trabalhando com genótipos de pinhão manso provenientes de diferentes regiões da Índia, Gohil *et al.* (2008) utilizaram o método de agrupamento de Tocher e também verificaram que não existiu relação entre a diversidade genética e a distribuição geográfica dos membros dos grupos.

O método UPGMA gerou 7 grupos, sendo três deles formados por indivíduos das duas coleções avaliadas. O grupo II é formado apenas por indivíduos da coleção da UFV e os grupos IV, VI e VII são formados cada um por um único acesso, os quais apresentaram variabilidade suficiente para não se enquadrarem em nenhum dos demais grupos, também se mostrando promissores para uso em cruzamentos.

Segundo Cruz *et al.* (2011) a escolha do método de agrupamento depende dos objetivos do estudo, já que métodos diferentes conduzem a resultados distintos. Verifica-se que os métodos utilizados no agrupamento dos acessos não geraram grupos iguais. Isso decorre do

fato de que, embora ambos realizem a separação em grupos através da utilização de algum critério, que no caso são as medidas de dissimilaridade, métodos hierárquicos como o UPGMA são empregados em estudos de diversidade genética principalmente por gerarem dendrogramas, que permitem uma fácil visualização da distância genética entre os acessos avaliados. No entanto, na separação de grupos gerados por esses métodos podem ocorrer variações de acordo com a metodologia utilizada, como o cálculo do ponto de corte. Enquanto isso, o método de Tocher é ideal para agrupamento de indivíduos, já que visa alcançar uma partição dos indivíduos que otimize os critérios avaliados, garantindo uma maior distância genética entre indivíduos de grupos diferentes do que a encontrada por membros do mesmo grupo. Assim, o método de Tocher é o mais indicado para responder aos objetivos desse trabalho.

No método UPGMA o coeficiente de Jaccard foi utilizado porque quando comparado com outros como o de Nei e Li e o de Coincidência Simples por Silva (2013), este apresentou dendrogramas mais representativos e com menor distorção.

A partir da matriz de dissimilaridade gerada entre os materiais avaliados foram selecionados os acessos mais similares e os mais divergentes, representados na Tabela 4.

A distância genética entre os acessos variou de 0,034 a 0,314. Os maiores índices de dissimilaridade foram observados entre os acessos P3 e P6, P7 e M13 e M5 e M8. O par de acessos mais divergente provém da coleção da UFC, o que indica que nessa coleção existem acessos de maior divergência genética que na coleção da UFV.

Os três pares de acessos mais similares são provenientes da coleção de germoplasma da UFV, indicando baixa distância genética entre esses materiais. Como os acessos foram coletados em diferentes regiões do Brasil, tais resultados sugerem uma base genética estreita para a espécie em todo o país.

As distâncias genéticas encontradas com maiores frequências foram representadas na Figura 2.

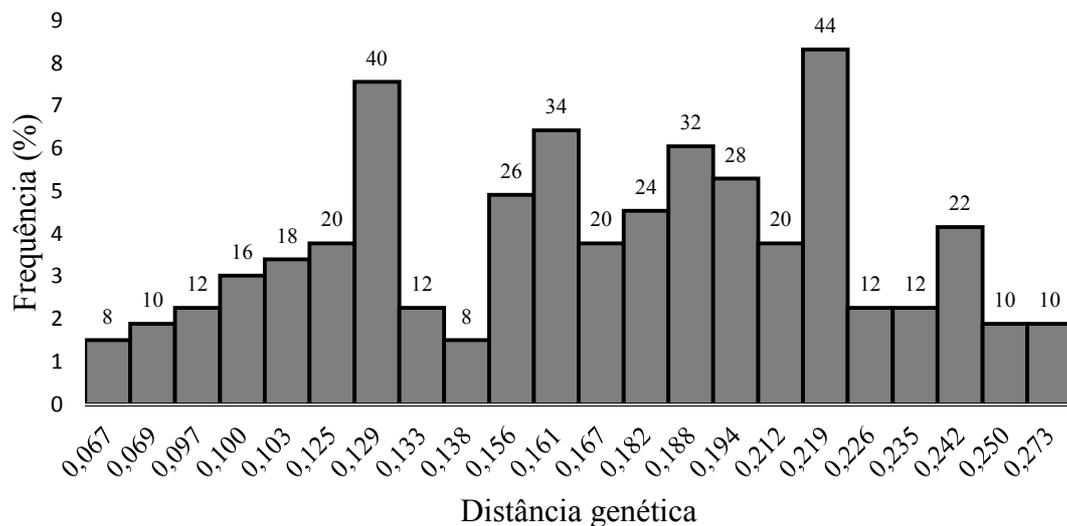
Tabela 4 – Separação dos pares de acessos das coleções de germoplasma com maior e menor similaridade e suas distâncias genéticas.

	Acessos	Distância genética
Mais divergentes	P3 e P6	0,314
	P7 e M13	0,303
	M5 e M8	0,303
	P9 e M10	0,294
	P1 e M5	0,281
	P6 e M6	0,281
	P9 e M5	0,281

continua

	conclusão	
	P3 e M5	0,272
	P6 e M7	0,272
	P3 e M13	0,264
Mais similares	M4 e M12	0,034
	M9 e M11	0,034
	M10 e M11	0,034
	P5 e M3	0,037
	P2 e P8	0,066
	P8 e P10	0,066
	P10 e M9	0,066
	M9 e M10	0,066
	P5 e P8	0,068
	P5 e M7	0,068

Figura 2 – Frequência das distâncias genéticas obtidas entre acessos da UFC e da UFV e seu número de repetição na matriz de dissimilaridade.



A distância genética média foi calculada a partir das distâncias geradas pela matriz de dissimilaridade e seu valor foi de 0,158. Os valores de distância genética representados na Figura 2 apresentam frequência acima de 1 %. A imagem também mostra o número de vezes que os valores ocorrem na matriz de dissimilaridade.

Foi calculado o coeficiente de correlação cofenética para avaliar a representatividade do dendrograma, como mostra a Tabela 5.

Tabela 5 – Coeficiente de correlação cofenética (CCC), estresse e distorção entre as matrizes de distância genética e a resultante do agrupamento dos acessos da UFC e da UFV.

Coeficiente de correlação cofenética	Estresse (%)	Distorção (%)
0,7195	21,7065	4,7171

O valor do coeficiente de correlação cofenética obtido foi de 0,7195. De acordo com Rohlf (1970) valores menores que 0,7 indicam inadequação do método, assim, pode-se afirmar que o dendrograma mostrado na Figura 3 foi representativo para os dados analisados, expressando bem os resultados do estudo.

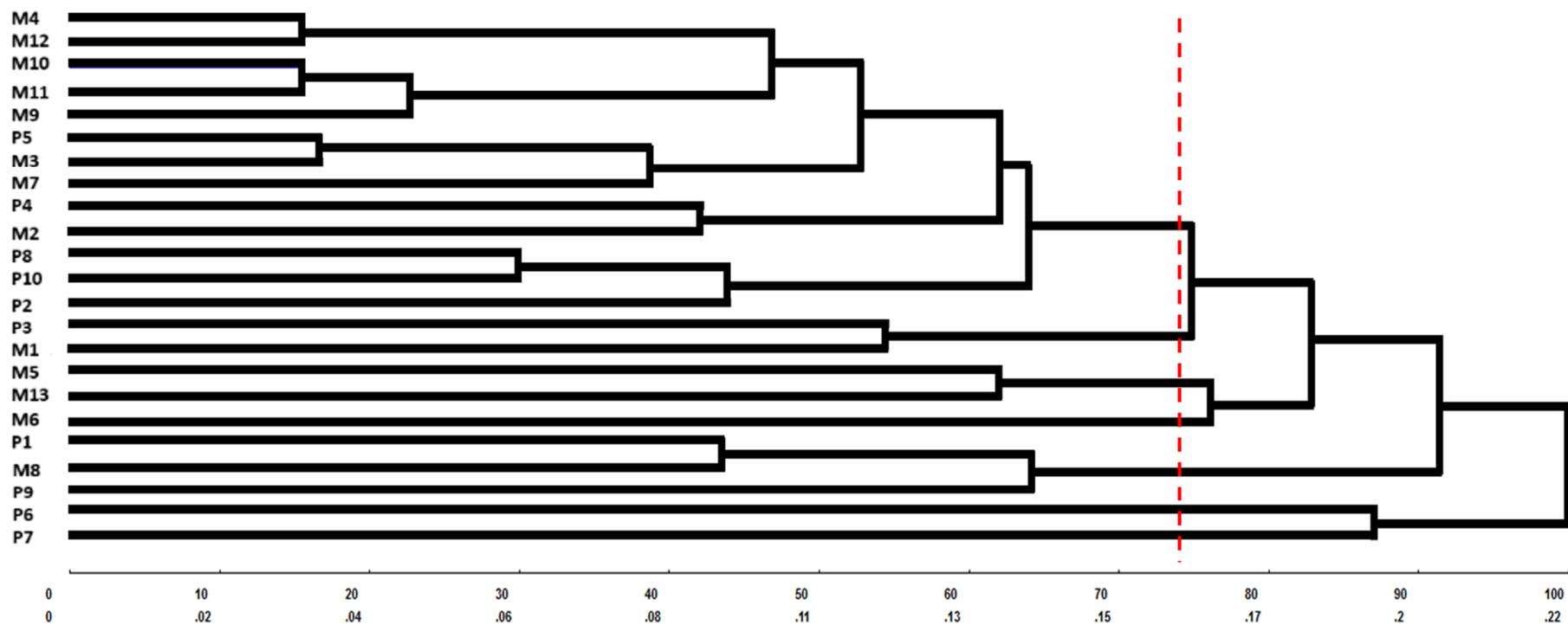
Outros pesquisadores obtiveram valores similares ao avaliar a espécie, como Silva (2013), que obteve o valor de correlação cofenética de 0,77 ao utilizar marcadores ISSR na caracterização de 43 acessos de pinhão manso. Reis *et al.* (2015) avaliando 60 acessos da coleção da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro a partir de iniciadores SSR, obtiveram o valor de correlação cofenética de 0,74 e Oliveira (2011) avaliando acessos da coleção de trabalho da Embrapa Clima Temperado também através de microssatélites obteve o valor de 0,78 para esse coeficiente.

A Tabela 5 também apresenta dados de estresse e distorção que, segundo Kruskal (1964) devem ser os menores possíveis para determinar boa precisão da projeção gráfica e tornar o agrupamento mais representativo.

A Figura 3 representa o dendrograma gerado pelo método UPGMA através do coeficiente de Jaccard. Como ele foi gerado com base na dissimilaridade genética, quanto maior o valor de dissimilaridade entre os pares de acesso, mais distante geneticamente são esses acessos.

Pode-se também observar na imagem o ponto de corte gerado pela distância genética média, que permitiu a divisão do acesso em 7 grupos, já mostrados na Tabela 3.

Figura 3 – Dendrograma de dissimilaridade genética entre acessos da UFC e UFV, obtido pelo método UPGMA.



5.2 Avaliação da diversidade genética entre genitores e progênies de meios-irmãos

Utilizando o método UPGMA através do complemento de Jaccard foi realizado o agrupamento dos indivíduos de acordo com sua distância genética. O mesmo foi feito através do método de Tocher e os grupos formados estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 – Agrupamento dos genitores e progênies pelo método de Tocher e pelo método UPGMA utilizando o complemento de Jaccard.

Grupo	Tocher	Jaccard
I	9, 10, 11, 12, 13, 14, 17	9, 10, 11, 12, 14, 16
II	P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7, P8, P9, P10, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 15, 16, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29	P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7, P8, P9, P10, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 13, 15, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29

Os grupos gerados pelos dois métodos foram bastante semelhantes, havendo divergência na separação de apenas 3 acessos, do total de 29. O número de grupos também foi o mesmo para os dois métodos, o que mostra boa representatividade de ambos, embora, como já citado anteriormente, o método de Tocher seja o mais indicado para esse tipo de divisão.

Nos grupos I gerados pelos dois métodos, observa-se a presença apenas de meios-irmãos, indicando que houve maior distância genética desses acessos com relação aos demais, contribuindo para o aumento da diversidade dentro da população.

Com a criação da matriz de dissimilaridade, foi possível observar as distâncias genéticas entre cada acesso e selecionar destas os valores menores e maiores, que representam os acessos mais similares e os mais divergentes respectivamente, conforme mostra a Tabela 7.

A distância genética entre os acessos variou de 0,629 a zero. O valor zero não pode garantir que os acessos estão repetidos, devido ao baixo número de iniciadores que geraram amplificação, mas significa que todos os locos amplificados pelos iniciadores em estudo se mostraram iguais para esses materiais.

Os maiores índices de dissimilaridade foram observados entre os acessos 10 e 23, 12 e 23 e 13 e 23. Esses acessos correspondem a progênies de meios-irmãos originados de plantas-mãe distintas e sua distância genética é superior à distância entre seus genitores. Esse aumento de variabilidade pode ser explicado pela fecundação cruzada que ocorre em plantas alógamas, como o pinhão manso. Nessas plantas o acasalamento ocorre ao acaso, já que o pólen

de uma planta tem a mesma chance de fecundar o óvulo de qualquer outra planta da população e assim, é de se esperar que os indivíduos sejam heterozigotos (BORÉM & MIRANDA, 2009).

Tabela 7 – Separação dos pares de acessos e progênes com maior e menor similaridade e suas distâncias genéticas.

	Acessos	Distância genética
Mais divergentes	10 e 23	0,629
	12 e 23	0,629
	13 e 23	0,629
	P7 e 10	0,615
	P7 e 12	0,615
	P7 e 13	0,615
	5 e 11	0,615
	10 e 29	0,615
	11 e 21	0,615
	12 e 29	0,615
Mais similares	10 e 12	0
	10 e 13	0
	12 e 13	0
	24 e 25	0,040
	25 e 28	0,040
	25 e 26	0,040
	8 e 15	0,068
	9 e 11	0,071
	17 e 24	0,076
27 e 38	0,076	

Pode-se ainda inferir sobre o possível ganho genético obtido pelo cruzamento ao acaso da população da coleção da UFC, indicando o cultivo de populações como alternativa para induzir uma maior dissimilaridade entre acessos de pinhão manso passíveis de seleção, objetivando o ganho genético no melhoramento.

Os acessos mais similares também são progênes de meios-irmãos, o que mostra que mesmo na polinização cruzada ainda existe a possibilidade de se formarem indivíduos mais semelhantes, cabendo ao melhorista realizar a seleção dos melhores materiais através de avaliações que podem ser morfo-agronômicas ou moleculares, ou ambas, já que as duas podem ser complementares. Segundo Borém & Miranda (2009) a insuficiente diversidade genética entre os genitores utilizados em cruzamentos pode reduzir a variabilidade genética, especialmente de caracteres quantitativos. Assim, o progresso genético do melhoramento com as características selecionadas pode ser limitado.

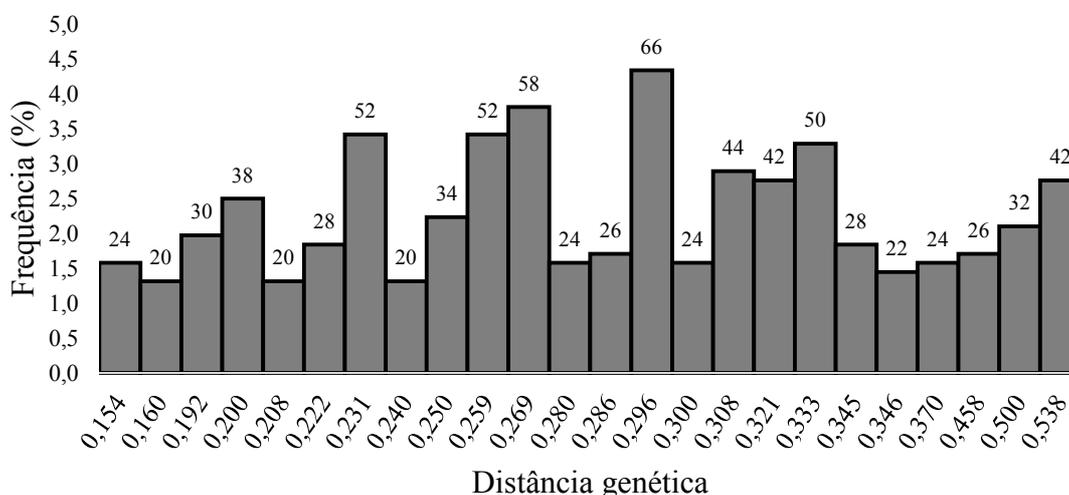
Populações alógamas muitas vezes apresentam um grande desafio aos melhoristas, já que ao selecionar genitores com características superiores não se pode esperar que sua

descendência tenha as mesmas características. Para que a diversidade genética disponível nos bancos de germoplasma seja bem utilizada é importante a realização da caracterização dos acessos de forma que o melhorista possa identificar os acessos potencialmente úteis para programas de melhoramento. Segundo Cruz *et al.* (2011) as análises de diversidade de diferentes acessos têm permitido estudos precisos da biodiversidade, de forma a orientar a utilização de diferentes genitores e assim um melhor planejamento dos cruzamentos a serem avaliados no programa de melhoramento.

Nesses termos, o agrupamento dos indivíduos já constitui dados importantes por mostrar os acessos mais divergentes. Segundo Borém & Miranda (2009) o uso de técnicas genético-estatísticas como a divergência genética é fundamental para a seleção de plantas a serem usadas nos programas de melhoramento, auxiliando no encontro de materiais com maior distância genética que possam gerar indivíduos heterozigotos que aumentem a média da população. Nesse sentido esse estudo mostrou-se adequado para essa finalidade, haja visto que foram identificados acessos divergentes.

As distâncias genéticas observadas com maiores frequências foram representadas na Figura 6. A distância genética média calculada a partir da matriz de dissimilaridade foi de 0,33. O resultado é similar ao encontrado por Silva (2013) e por Patcharin *et al.* (2011), pois o primeiro, ao trabalhar com pinhão manso, obteve uma distância média de 0,38 e o segundo, ao trabalhar com plantas da família Euphorbiaceae, incluindo acessos de pinhão manso, encontrou o valor de 0,35.

Figura 4 – Frequência das distâncias genéticas obtidas entre genitores e progênes de meios-irmãos e seu número de repetição na matriz de dissimilaridade.



Na Figura 4 estão representados os valores de distância genética com frequência acima de 1% e o número de vezes que eles ocorrem na matriz de dissimilaridade. Pelo número elevado de distâncias encontradas, percebe-se que os dados não seguem um padrão normal, resultado esperado já que as progênies foram geradas por fecundação cruzada, ao acaso.

Considerando os genitores e suas progênies como duas populações distintas, foi possível calcular os valores médios de heterozigose para os locus avaliados, que foram de 0,18 para as plantas-mãe e 0,35 para as famílias de meios-irmãos. Esses dados afirmam o aumento de variabilidade das progênies descendentes de acasalamentos ao acaso, sugerindo que maiores distâncias genéticas possam ser obtidas nos próximos cruzamentos antes de atingir o equilíbrio de Hardy-Weinberg. Esse equilíbrio ocorre nas populações de plantas alógamas quando bem estabelecidas e sem intervenções por seleção, correspondendo à constância nas frequências genéticas.

A consistência do padrão de agrupamento foi dada pelo coeficiente de correlação cofenética, representado na Tabela 8.

Tabela 8 – Coeficiente de correlação cofenética (CCC), estresse e distorção entre as matrizes de distância genética e a resultante do agrupamento dos genitores e suas progênies.

Coeficiente de correlação cofenética	Estresse (%)	Distorção (%)
0,9114	15,4077	2,3743

O valor do coeficiente de correlação cofenética obtido foi de 0,9114, muito acima do limite estabelecido por Rohlf (1970) para que o método de agrupamento seja adequado ao resumir a informação do conjunto de dados. Assim houve ótima representatividade do dendrograma, que foi eficiente também na separação dos grupos de acordo com sua proximidade genética.

São poucos os resultados encontrados na literatura com coeficiente de correlação cofenética acima de 0,9, mas pesquisadores como Kneib *et al.* (2011) utilizando microssatélites para a mesma cultura obteve coeficiente de correlação cofenética igual a 0,98.

Além da correlação cofenética, a Tabela 8 apresenta dados de estresse e distorção, sendo o segundo bastante baixo, mostrando um pequeno grau de deformação do dendrograma.

O dendrograma gerado pelo método UPGMA está representado na Figura 5. Ele foi gerado com base na dissimilaridade genética, o que significa que quanto maior o valor de dissimilaridade entre os pares de acesso, valores estes representados na linha horizontal, mais distante geneticamente são esses acessos.

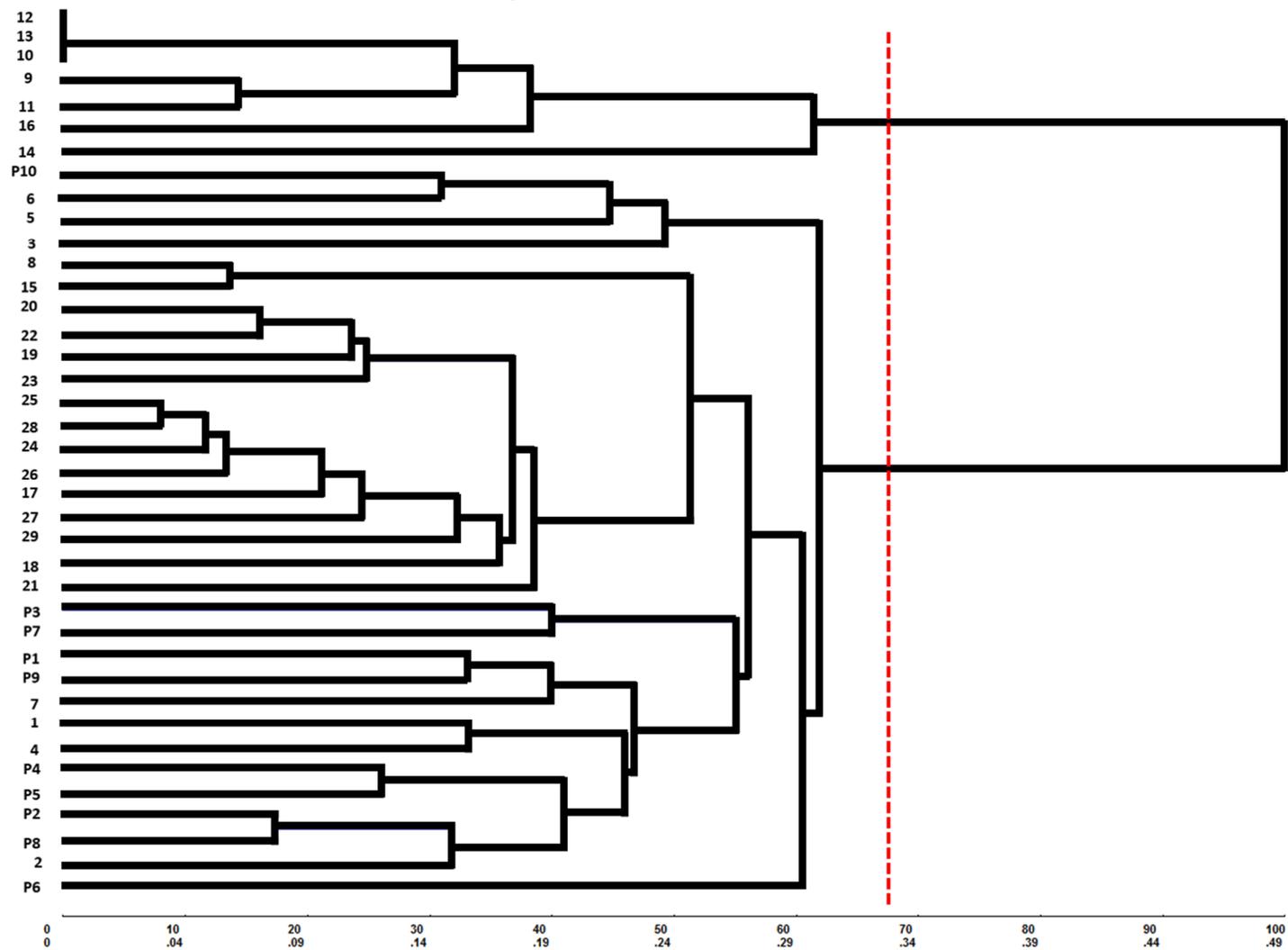
Na imagem tem-se destaque para o ponto de corte, gerado pela distância genética média, o qual permitiu a divisão dos acessos em dois grupos, o primeiro com 6 acessos e o segundo com 33. O primeiro grupo se destaca por ser formado apenas de indivíduos das progênies de meios-irmãos. Isso mostra que esses 6 indivíduos apresentaram distâncias genéticas elevadas com relação às outras progênies e mesmo aos seus genitores. Tal fato confirma aumento da variabilidade genética na população, e tais indivíduos deverão ser analisados quanto às características de interesse que se buscam para a espécie para possível uso em programas de melhoramento de pinhão manso.

Avaliando 18 acessos da coleção de trabalho da Embrapa Clima Temperado, Oliveira *et al.* (2012) também verificaram um pequeno número de grupos formados pelo dendrograma, com total de 3. No entanto, a dissimilaridade média obtida foi de 0,73, valor bastante alto quando comparado com o presente trabalho. Vale ressaltar que os materiais em estudo já haviam sido previamente selecionados, por fazerem parte dos acessos de trabalho, o que deve justificar as maiores dissimilaridades.

Soares (2010) também obteve a formação de dois grupos pelo método UPGMA analisando 46 acessos de pinhão manso provenientes do Brasil, China e Cabo Verde através de marcadores ISSR e RAPD.

Trabalhos de caracterização através de variáveis morfológicas com a espécie apresentaram maiores números de agrupamentos, como o de Pazeto *et al.* (2011) com 7 grupos formados a partir do método UPGMA e distância Euclidiana.

Figura 5 – Dendrograma de dissimilaridade genética entre genitores e suas progênes, obtido pelo método UPGMA.



6 CONCLUSÕES

- a) Os acessos de pinhão manso estudados apresentam base genética estreita;
- b) Os acessos mais divergentes podem ser utilizados como fonte de variação genética em cruzamentos de programas de melhoramento genético;
- c) Houve aumento considerável na variabilidade genética das progênies com relação aos seus genitores.

REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, F. A. *et al.* Crescimento e desenvolvimento do pinhão manso: 1º ano agrícola. **Campina Grande: Embrapa Algodão**, p. 21, 2008.
- ALMEIDA, C. M. A. *et al.* Caracterização molecular de cultivares de cana-de-açúcar utilizando marcadores ISSR. 2009.
- ARAÚJO, E. C. E.; RIBEIRO, A. M. B. **Avaliação fenológica do pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) no município de Teresina-PI**. In: Congresso Brasileiro de Plantas Oleaginosas, óleos, Gorduras e Biodiesel, 5, 2008, Lavras-MG. Anais... Lavras-MG, UFLA, 2008.
- ARRUDA, F. P. *et al.* **Cultivo de Pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) como alternativa para o semi-árido nordestino**. Rev. Bras. Ol. Fibros, Campina Grande, v. 8, n.1, p. 789-799, 2004.
- 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, n. 176, p. 812-823, 2009.
- BELTRÃO, N. E. M. *et al.* **Alerta sobre o plantio de pinhão manso no Brasil**. Embrapa Algodão. Documentos, 155. Campina Grande, p.15, 2006.
- BORÉM, A.; MIRANDA, G.V. **Melhoramento de Plantas**. 4. ed. Viçosa: UFV, 2005.
- BORÉM, A.; MIRANDA, G.V. **Melhoramento de Plantas**. 5. ed. Viçosa: UFV, 2009.
- BORÉM, A. **Melhoramento de Plantas**. 2. ed. Universidade Federal de Viçosa, 453p., 1998.
- BRASIL. Instrução Normativa N° 4, de 14 de janeiro de 2008. **Lex**: Diário Oficial da União, Brasília, DF, 2008, Seção 1, P. 4.
- BRITTAINE, R.; LUTALADIO, N. **Jatropha: a smallholder bioenergy crop**. Integrated Crop Management, 8, 2010. 114p.
- BURKILL, I. H. *et al.* A dictionary of the economic products of the Malay Peninsula. **A Dictionary of the Economic Products of the Malay Peninsula**. v. 2, n. 2nd edition, 1966.
- CASARINI, M. B.; FERRARI, R. A.; MARQUES, D. A. **Rendimento e qualidade do óleo de pinhão manso (*Jatropha curcas*), Avaliação dos fatores antinutricionais do farelo**. In: 3º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica, 2009, Campinas. Anais... Campinas: IAC, 2009, v. 901004, p. 7-12.
- CRUZ, C. D. **Programa Genes: Diversidade Genética**. Editora UFV. Viçosa (MG). 278p. 2008.
- CRUZ, C. D.; FERREIRA, F. M.; PESSONI, L. A. **Biometria aplicada ao estudo da diversidade genética**. Visconde do Rio Branco, Suprema, 2011. 620p.

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

DURÃES, F. O. M. *et al.* Pesquisa, desenvolvimento e inovação em pinhão-mansô para produção de biocombustíveis. **Brasília: Embrapa Agroenergia**, 2009.

EMBRAPA. **Pinhão-mansô: cultivares, sistemas de produção e destoxificação da torta são alvos da pesquisa**. Agência de Notícias. Brasília. 2013. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/1471675/pinhao-manso-cultivares-sistema-de-producao-e-destoxificacao-da-torta-sao-alvos-da-pesquisa>> Acesso em junho de 2015.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPLAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análises genéticas**. 3. ed. Brasília, DF: EMBRAPACERNAGEN, 1998. 220 p.

GOMES, S. O. **Caracterização molecular em acessos de pinhão mansô (*Jatropha curcas* L.) por meio de marcadores ISSR**. 57p. Universidade Federal do Piauí, 2013.

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**. Mol Biol Rep. v. 38, p. 4245-4256, 2010.

GUIMARÃES, C. T. Aplicação de marcadores moleculares no melhoramento genético. XXV Congresso Nacional de Milho e Sorgo. 29 ago a 02 set. Cuiabá –MT, 2004.

GOHIL, R. H. *et al.* Genetic diversity assessment in physic nut (*Jatropha curcas* L.). **Int J Plant Prod**, v. 2, n. 4, p. 321-326, 2008.

GUPTA, S. *et al.* Analogy of ISSR and RAPD markers for comparative analysis of genetic diversity among different *Jatropha curcas* genotypes. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 23, 2008.

HELLER, J. Physic nut. ***Jatropha curcas***, p. 44, 1996.

IKBAL, K.; DHILLON, R. S. Evaluation of genetic diversity in *Jatropha curcas* L. using RAPD markers. **Indian J Biotechnol**, v. 9, p. 50-57, 2010.

JAIN, S.; SHARMA, M. N. **Prospects of biodiesel from *Jatropha* in India: a review**. Renewable & Sustainable Energy Reviews, v14, p. 763–71, 2010.

JUHÁSZ, A. C. P. *et al.* Melhoramento genético de *Jatropha curcas*: considerações e metodologias. **Embrapa Agroenergia - Capítulo em livro técnico-científico (ALICE)**, 2013.

KAFKAS, S. *et al.* Detecting DNA polymorphism and genetic diversity in a wide pistachio germplasm: Comparison of AFLP, ISSR, and RAPD markers. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 131, n. 4, p. 522-529, 2006.

KAUSHIK, N. *et al.* **Genetic variability and divergence studies in seed traits and oil content of *Jatropha* (*Jatropha curcas* L.) accessions.** *Biomass & Bioenergy*, v.31, p.497-502, 2007.

KNEIB, R. B.; VILLELA, J. C. B. Caracterização molecular de genótipos de pinhão-mansô (*Jatropha curcas* L.). In: **Embrapa Clima Temperado-Artigo em anais de congresso (ALICE)**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISA EM PINHÃO-MANSO, 2., 2011, Brasília, DF. Pinhão-mansô: focando em soluções sustentáveis para produção de biocombustíveis: anais. Brasília, DF: Embrapa Agroenergia: ABPPM, 2011. 1 CD-ROM. (Embrapa Agroenergia. Documentos, 005)., 2012.

KOHLI, A. *et al.* *Jatropha* as a novel non-edible oilseed plant for biodiesel. In: FERRY, N.; GATEHOUSE, A. M. R. (Ed.). ***Environmental impact of genetically modified novel crops***. London: CAB International, 2009. p. 294–322. Chapter 14.

KRUSKAL, J. B. **Multidimensional scaling by optimizing goodness of fit to a nometric hypothesis.** *Psychometrika*, v. 29, p. 1-27, 1964.

KUMAR, R. S.; PARTHIBAN K. T.; RAO, M. G. **Molecular characterization of *Jatropha* genetic resources through inter-simple sequence repeat (ISSR) markers.** *Molecular Biology Reports*. v. 36. p. 1951–1956, 2009.

KUMAR, S. A.; SUDISHA, J.; SREENATH, H. L. Genetic relation of *Coffea* and Indian *Psilanthus* species as revealed through RAPD and ISSR markers. ***International Journal of Integrative Biology***, v. 3, n. 3, p. 150-158, 2008.

LAVIOLA, B. G. *et al.* Caracterização morfo-agronômica do banco de germoplasma de pinhão mansô. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PLANTAS OLEAGINOSAS, ÓLEOS, GORDURAS E BIODIESEL, 6., 2009, Montes Claros. **Anais...** Lavras: UFLA, 2009. v. 6.

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

LAVIOLA, B. G. *et al.* Genetic parameters and variability in physic nut accessions during early developmental stages. ***Pesquisa Agropecuária Brasileira***, Brasília, v. 45, 2010.

MARQUES, D. A. **Pinhão manso para produção de biodiesel: um promissor negócio ou um grande desastre.** APTA, São Paulo, ago. 2007. Disponível em: <<http://www.apta.sp.gov.br/noticias.php?id=2709>>. Acesso em: 20 mai. 2015.

MARQUES, D. A., FERRARI, R. A. O Papel das Novas Biotecnologias no Melhoramento Genético do Pinhão Manso. ***Biológico***. São Paulo, v.70, n.2, p.65-67, jul-dez, 2008.

MELLO, V.S. *et al.* Estudo para a utilização da semente do Pinhão-mansô na produção de biocombustível. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOCMBUSTÍVEIS, 2., 2009, Recife. Anais eletrônicos... Recife: Associação Brasileira de Química – ABQ. 2009. Disponível em: <<http://www.abq.org.br/biocom/2009/trabalhos/-7-4564.htm>>. Acesso em: 1 mai. 2015.

MENDONÇA, S.; LAVIOLA, B. G. Uso potencial e toxidez da torta de pinhão-mansô. 2009.

MILACH, S. C. K. **Marcadores de DNA em plantas**. Porto Alegre: UFRGS, 1998. 141p.

NUNES, F. N. *et al.* **Morfologia externa de frutos, sementes e plântulas de pinhão manso**. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v.44, n.2, p.207-210, 2009.

OLIVEIRA, R. J. P.; BRANCO, J. C. Distâncias genéticas entre acessos de pinhão manso da coleção de trabalho da Embrapa Clima Temperado a partir de dados moleculares e morfológicos. In: **Embrapa Clima Temperado-Artigo em anais de congresso (ALICE)**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISA EM PINHÃO-MANSO, 2., 2011, Brasília, DF. Pinhão-manso: focando em soluções sustentáveis para produção de biocombustíveis: anais. Brasília, DF: Embrapa Agroenergia: ABPPM, 2011. 1 CD-ROM. (Embrapa Agroenergia. Documentos, 005)., 2012.

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

PATCHARIN, T. *et al.* **Genetic diversity among *Jatropha* and *Jatropha*-related species based on ISSR markers**. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 29, p. 252–264, 2011.

PAZETO, M. S. R. *et al.* CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA ENTRE ACESSOS DE *Jatropha curcas* L. **Ciência & Tecnologia**, v. 3, n. Supl., 2013.

PAZETO, M. S. R. Estudo da diversidade genética em acessos de *Jatropha* spp. por meio de caracteres morfológicos e marcadores moleculares ISSR. 2013.

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

RABELO, H. O. **Caracterização e desempenho de meios-irmãos de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.)**. Janaúba, 2010. Monografia – Universidade Estadual de Montes Claros, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, 2010.

REIS, M. V. M. *et al.* Variabilidade genética e associação entre caracteres em germoplasma de pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.). **Revista Ciência Agronômica**, v. 46, n. 2, p. 412-420, 2015.

ROHLF, F. J. **Adaptative hierarquical clustering schemes**. **Systematic Zoology**, v.19, n.1, p.58-82, 1970.

ROSADO, T. B. *et al.* **Avaliação da diversidade genética do banco de germoplasma de pinhão manso por marcadores moleculares**. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**. Brasília: Embrapa Agroenergia, p. 16, 2009.

SATURNINO, H. M. *et al.* **Cultura do pinhão manso (*Jatropha curcas* L.). Produção de oleaginosas para biodiesel**. Informe Agropecuário, Belo Horizonte-MG, v. 26, n. 229, p. 44-74, 2005.

SEVERINO, L. S. **Viagem à Índia para prospecção de tecnologias sobre mamona e pinhão manso**. Embrapa Algodão, 2006.

SILVA, A. P. M. **Caracterização de acessos de *Jatropha curcas* da coleção de germoplasma da Universidade Federal do Ceará**. 2013. 66 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, Ceará. 2013.

SILVA, C. J. **Variabilidade Genética de *Jatropha curcas* L.** Santiago, Chile, 27 jun. 2008. Disponível em: < http://www.cne.cl/archivos_bajar/jatropha/Cesar_Jose_da-Silva.pdf>. Acesso em: 25 abr. 2015.

SILVA, João Alfredo Neto et al. Crescimento e produção de espécies forrageiras consorciadas com pinhão-manso. **Pesq. agropec. bras., Brasília**, v. 47, n. 6, p. 769-775, 2012.

SILVA, P. R. C. Agricultura e pecuária: biodiesel de *Jatropha curcas* L. **Serviço brasileiro de respostas técnicas**. Bahia, Fev. 2006. Disponível em: <<http://sbrt.ibict.br>> Acesso em: 14 abr. 2015.

SINGH, Priyamvada et al. Molecular characterization of genetic diversity in *Jatropha curcas* L. **Genes Genomes Genomics**, v. 4, p. 1-8, 2010.

SOARES, B. O. **Diversidade genética de genótipos de pinhão-manso por meio de RAPD e ISSR**. 2010. 54 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal no Semiárido) – Universidade Federal de Montes Claros. Montes Claros, Minas Gerais. 2010.

SOUZA, Andreyb Cândido et al. Consórcio de pinhão manso e feijoeiro: alternativa para agricultura familiar. **Agrarian**, v. 6, n. 19, p. 36-42, 2012.

SPINELLI, Victor Mousinho et al. Yield performance of half-sib families of physic nut (*Jatropha curcas* L.). **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 14, n. 1, p. 49-53, 2014.

TAPANES, N. C. O. *et al.* **Transesterification of *Jatropha curcas* oil glycerides: theoretical and experimental studies of biodiesel reaction**. *Fuel*, vol. 87, n°10-11, p.2286-2295, 2008.

TOMINAGA, N. *et al.* **Cultivo do pinhão-manso para produção de biodiesel**. Viçosa, Centro de Produções Técnicas – CPT, 2007. 220p.

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

XAVIER, G. R. *et al.* Variabilidade genética em acessos de caupi analisada por meio de marcadores RAPD. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, n. 4, p. 353-359, 2005.

YE, M. *et al.* **Current situation and prospects of *Jatropha curcas* as a multipurpose tree in China**. *Agroforest System*, Dordrecht, v. 76, p. 487-497, 2009.

APÊNDICE A – MATRIZ DE DISSIMILARIDADE OBTIDA PARA OS 10 GENITORES E AS 29 FAMÍLIAS DE MEIOS-IRMÃOS

	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
P1	0	0,17	0,30	0,20	0,17	0,28	0,28	0,24	0,17	0,26	0,20	0,23	0,29	0,28	0,33	0,27	0,20	0,33	0,43	0,46
P2		0	0,30	0,27	0,17	0,28	0,21	0,09	0,17	0,32	0,20	0,16	0,29	0,21	0,27	0,27	0,20	0,33	0,50	0,46
P3			0	0,19	0,24	0,39	0,20	0,23	0,30	0,25	0,26	0,34	0,41	0,27	0,32	0,26	0,32	0,21	0,48	0,56
P4				0	0,13	0,31	0,31	0,20	0,20	0,22	0,23	0,26	0,32	0,24	0,30	0,30	0,30	0,24	0,46	0,54
P5					0	0,29	0,22	0,09	0,25	0,27	0,21	0,24	0,30	0,22	0,35	0,28	0,35	0,34	0,38	0,48
P6						0	0,25	0,28	0,21	0,30	0,31	0,27	0,26	0,25	0,37	0,43	0,37	0,31	0,54	0,56
P7							0	0,21	0,28	0,36	0,37	0,27	0,33	0,25	0,31	0,37	0,37	0,31	0,54	0,62
P8								0	0,24	0,26	0,20	0,16	0,29	0,21	0,33	0,27	0,27	0,28	0,43	0,46
P9									0	0,32	0,20	0,23	0,29	0,21	0,27	0,33	0,20	0,33	0,56	0,52
P10										0	0,29	0,31	0,24	0,30	0,29	0,15	0,34	0,17	0,44	0,46
1											0	0,26	0,32	0,17	0,30	0,23	0,23	0,30	0,39	0,35
2												0	0,35	0,33	0,32	0,32	0,26	0,27	0,48	0,44
3													0	0,18	0,25	0,25	0,38	0,38	0,50	0,52
4														0	0,24	0,31	0,31	0,31	0,48	0,50
5															0	0,16	0,36	0,30	0,58	0,54
6																0	0,36	0,30	0,46	0,42
7																	0	0,24	0,58	0,48
8																		0	0,55	0,52
9																			0	0,19
10																				0

continua

continuação

	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29
P1	0,48	0,46	0,46	0,38	0,33	0,35	0,26	0,23	0,27	0,26	0,27	0,27	0,31	0,19	0,16	0,20	0,23	0,19	0,21
P2	0,54	0,46	0,46	0,44	0,33	0,42	0,32	0,23	0,27	0,19	0,20	0,20	0,31	0,26	0,23	0,27	0,30	0,26	0,21
P3	0,52	0,56	0,56	0,48	0,27	0,46	0,25	0,29	0,26	0,31	0,26	0,26	0,30	0,25	0,22	0,26	0,22	0,19	0,27
P4	0,50	0,54	0,54	0,41	0,30	0,44	0,22	0,26	0,23	0,22	0,23	0,16	0,20	0,22	0,19	0,23	0,26	0,15	0,17
P5	0,43	0,48	0,48	0,46	0,40	0,36	0,33	0,31	0,35	0,33	0,28	0,28	0,32	0,27	0,24	0,28	0,31	0,27	0,22
P6	0,58	0,56	0,56	0,48	0,37	0,52	0,30	0,33	0,37	0,30	0,37	0,31	0,35	0,23	0,27	0,24	0,33	0,30	0,32
P7	0,58	0,62	0,62	0,59	0,37	0,52	0,30	0,27	0,37	0,36	0,31	0,31	0,35	0,23	0,27	0,31	0,27	0,30	0,25
P8	0,48	0,46	0,46	0,44	0,33	0,42	0,32	0,30	0,27	0,26	0,27	0,20	0,31	0,26	0,23	0,27	0,30	0,26	0,21
P9	0,60	0,52	0,52	0,38	0,33	0,48	0,32	0,30	0,27	0,19	0,27	0,20	0,31	0,32	0,30	0,33	0,36	0,26	0,28
P10	0,48	0,46	0,46	0,33	0,23	0,42	0,28	0,25	0,29	0,28	0,34	0,29	0,32	0,21	0,19	0,22	0,19	0,21	0,30
1	0,43	0,35	0,35	0,35	0,30	0,30	0,34	0,38	0,30	0,29	0,30	0,30	0,39	0,34	0,32	0,30	0,38	0,29	0,37
2	0,52	0,44	0,44	0,43	0,27	0,40	0,31	0,29	0,32	0,25	0,32	0,26	0,36	0,25	0,29	0,32	0,34	0,31	0,27
3	0,55	0,52	0,52	0,50	0,43	0,48	0,43	0,35	0,32	0,37	0,38	0,32	0,36	0,37	0,35	0,32	0,28	0,37	0,26
4	0,52	0,50	0,50	0,48	0,37	0,46	0,36	0,33	0,31	0,30	0,31	0,24	0,35	0,36	0,33	0,31	0,33	0,30	0,32
5	0,62	0,54	0,54	0,46	0,30	0,50	0,34	0,32	0,30	0,29	0,23	0,30	0,33	0,34	0,38	0,41	0,32	0,34	0,31
6	0,50	0,42	0,42	0,41	0,30	0,38	0,40	0,32	0,30	0,34	0,30	0,36	0,39	0,34	0,32	0,36	0,26	0,34	0,31
7	0,56	0,48	0,48	0,35	0,24	0,44	0,29	0,32	0,23	0,22	0,30	0,23	0,33	0,29	0,26	0,30	0,32	0,22	0,31
8	0,54	0,52	0,52	0,34	0,07	0,48	0,17	0,27	0,24	0,23	0,30	0,24	0,28	0,17	0,21	0,24	0,21	0,17	0,31
9	0,07	0,19	0,19	0,38	0,55	0,24	0,50	0,54	0,52	0,56	0,58	0,52	0,56	0,50	0,48	0,46	0,54	0,50	0,54
10	0,13	0,00	0,00	0,25	0,46	0,18	0,57	0,56	0,54	0,52	0,59	0,54	0,63	0,57	0,56	0,54	0,61	0,57	0,62

continua

