

1 **Caracterização molecular de acessos de pinhão-manso cultivados em Itacoatiara-AM.**

2
3
4
5 Naiara Alfaia de OLIVEIRA¹; Fábio Medeiros FERREIRA¹; Welma Souza SILVA¹

6 ¹Universidade Federal do Amazonas – UFAM, Instituto de Ciências Exatas e Tecnologia-

7 ICET, Rua Nossa Senhora do Rosário, 3863, Itacoatiara – AM CEP:69103-128

8 Email: nai.alf@hotmail.com; fmferreira77@gmail.com; welmabio@gmail.com

9
10
11 **Sr(a). Revisor(a).**

12 **Agradecemos V.Sa. pelos comentários e sugestões que ajudaram a aperfeiçoar o texto científico. Assim**
13 **fazemos as seguintes considerações:**

14 a) A discussão foi mais bem descrita com a inclusão de trechos de referenciais bibliográficos:

15 b) Sobre a discussão dos métodos de agrupamento cabe esclarecer que as técnicas são consagradas e
16 frequentemente utilizadas nos estudos de diversidade e sob os objetivos do trabalho serviram como ferramentas
17 para aferir o grau de divergência ou similaridade dos acessos de pinhão manso. Além disso, as técnicas aqui
18 utilizadas geram informações complementares, portanto, não são métodos concorrentes. Assim, quando utilizasse
19 um método como UPGMA, técnica esta muito difundida na literatura, mas cuja interpretação de agrupamento pode
20 ser subjetiva, é importante complementá-la com outras técnicas de filosofia estatística diferente a fim de melhorar o
21 poder de decisão do pesquisador, a exemplo dos métodos usados como a projeção 3D e otimização de Tocher. É
22 possível que dadas as limitações de laudas que compõem um manuscrito/artigo científico seja necessário abdicar
23 de um dos métodos, mas citá(s)-lo(s) que foram utilizados dá confiabilidade na decisão dos grupos/agrupamento
24 formado;

25 c) Informação sobre o centro de origem da espécie foi brevemente acrescido no texto da discussão (linhas 236 a
26 240);

27 d) A conclusão foi reescrita considerando as sugestões dadas.

32 **Caracterização molecular de acessos de pinhão-manso cultivados em Itacoatiara-AM**

33

34 **RESUMO:** O pinhão manso (*Jatropha curcas* L), pertencente à família Euphorbiaceae, é um
35 arbusto perene, provavelmente nativo da América Central e amplamente presente na América
36 Central e do Sul, África e Ásia. Por se tratar de uma árvore com potencial à extração de óleo
37 e, por conseguinte, produção de biocombustíveis, pesquisas têm sido intensificadas para o
38 desenvolvimento de componentes tecnológicos no campo, dentre os quais o melhoramento
39 genético está inserido. O conhecimento sobre a diversidade genética disponível é essencial ao
40 processo de ganhos por seleção no melhoramento. Assim, objetivou-se realizar a
41 caracterização molecular de 90 acessos de pinhão-manso do município de Itacoatiara-AM e
42 de outras regiões, utilizando marcadores RAPD. A concentração, bem como a qualidade de
43 DNA foi suficiente para várias reações de amplificação por PCR. Os produtos de
44 amplificação obtidos foram reprodutíveis, após diferentes reações. Os seis *primers* RAPD
45 usados amplificaram 110 bandas, com uma média de 18,3 por iniciador. Destas apenas duas
46 bandas foram monomórficas para os 90 acessos. O número de bandas detectadas variou de
47 oito a vinte e quatro por *primer*. O grupamento obtido pela técnica UPGMA, Tocher e
48 projeção tridimensional revelou que não houve agrupamento específico por origem
49 geográfica, corroborando com a literatura, que tem sinalizado estreita base genética da espécie
50 *J. curcas*, em especial ao germoplasma brasileiro. No entanto, foram obtidos grupos pelas
51 técnicas de agrupamento, os quais indicam a possibilidade de se explorar cruzamentos como
52 estratégia ao melhoramento genético desta oleaginosa para ampliar a variabilidade genética,
53 bem como introdução de novos genótipos as coleções de trabalho.

54

55 **Palavras-Chaves:** *Jatropha curcas*, RAPD, diversidade genética.

56

57

58

59

60

61

62

63

64

65

66 **ABSTRACT:** Physic nut (*Jatropha curcas* L.), belonging to the family Euphorbiaceae, is an
67 evergreen shrub, native of Central America and probably widely present in all of Central and
68 South America, Africa and Asia. Despite its specie with potential for oil extraction and,
69 therefore, production of biofuels, research has intensified to the development of technology
70 components in the field, among which genetic improvement is inserted. Knowledge of the
71 genetic diversity available is essential to the process of selection gains into breeding. Thus,
72 the objective was to perform characterization of 90 accessions of physic nut in Itacoatiara-AM
73 and other regions, using molecular markers. The concentration and quality of DNA was
74 sufficient for several PCR amplification reactions. The amplification products obtained were
75 reproducible after different reactions. The six RAPD primers used amplified 110 markers,
76 with an average of 18.3 by primer. Of these only two markers were monomorphic for all 90
77 accessions. The number of bands detected ranged from eight to twenty-four primers. The
78 grouping obtained by UPGMA, Tocher and three-dimensional projection revealed no specific
79 clustering by geographical origin, supporting the literature which has signaled narrow genetic
80 base of the species *J. curcas*, especially the Brazilian germplasm. However, groups were
81 obtained by clustering techniques, which indicate the possibility of exploring the crossing as a
82 strategy for improvement of this oilseed increasing the genetic variability as well as
83 introduction of new genotypes collections work.

84

85

86 **Keywords:** *Jatropha curcas*, RAPD, genetic diversity.

87

88 INTRODUÇÃO

89 O pinhão manso (*Jatropha curcas* L), pertencente à família Euphorbiaceae, é um arbusto
90 perene, nativo provavelmente da América Central e amplamente presente em toda a América
91 Central, África, Ásia e América do Sul (BASHA *et al.*, 2009). Tradicionalmente, sementes de
92 pinhão manso e outras partes das plantas foram utilizadas para produção de óleo, sabão e
93 medicamentos diversos (KOHLI *et al.*, 2009). Sua recente popularidade deve-se a extração do
94 óleo de seus grãos como fonte potencial primária a produção de biocombustíveis.

95 O pinhão manso é uma das únicas oleaginosas que não compete diretamente com a
96 agricultura de alimentos e é compatível com perfil da agricultura familiar (LAVIOLA *et al.*,
97 2009). O rendimento potencial do pinhão manso varia de 2 a 5 toneladas.ha⁻¹.ano⁻¹,
98 dependendo do solo, nutrientes e condições de precipitação (FRANCIS *et al.*, 2005). Os grãos
99 contêm entre 30 e 35% de óleo que pode ser convertido por transesterificação em biodiesel
100 com alta qualidade (BASHA *et al.*, 2009).

101 Apesar da potencialidade do pinhão manso, diversos fatores devem ser compreendidos
102 para a completa domesticação da espécie. Dentre eles, o conhecimento da variabilidade
103 genética disponível, a fim de se avançar com sustentabilidade no processo de ganho genético
104 por seleção. Normalmente, a diversidade genética de uma espécie é armazenada em bancos de
105 germoplasma, fundamentais, pois permitem ao melhorista obter genes/alelos, a serem
106 incorporados aos trabalhos de melhoramento genético além de evitar a erosão genética
107 (BUENO *et al.*, 2001).

108 Normalmente, para usar a diversidade genética existente nas coleções, o melhorista
109 precisar manipular o germoplasma disponível, buscando genótipos que, através de
110 metodologias adequadas, possa gerar materiais genéticos superiores. Várias pesquisas têm
111 sido realizadas utilizando marcadores moleculares para estimar a diversidade genética
112 existente nas coleções. (BORÉM & CAIXETA, 2009).

113 Diferentes tipos de marcadores moleculares de DNA estão hoje disponíveis,
114 diferenciando entre si quanto à habilidade em detectar polimorfismo. Eles têm sido utilizados
115 em estudos de diversidade genética, *fingerprinting*, análises de pureza de sementes,
116 melhoramento assistido, mapeamento genético e isolamento de genes (BORÉM &
117 CAIXETA, 2009). Dentre esses marcadores, a técnica de polimorfismo de DNA amplificado

118 ao acaso, conhecida como RAPD (acrônimo do inglês, Random Amplified Polymorphic
119 DNA) é a mais acessível. Apesar de atualmente a posicionarem como ultrapassada, é o
120 método de amplificação de DNA que apresenta menor custo e já vem sendo usada com
121 sucesso para estudos de diversidade genética em várias espécies (OLIVEIRA, 2010),
122 inclusive com o pinhão manso, de forma única ou associada a outros tipos de marcadores
123 (BASH & SUJATHA, 2007; BASHA *et al.*, 2009; PAMIDIAMARRI *et al.*, 2009; SUNIL *et*
124 *al.*, 2011). A técnica consiste em amplificação simultânea de vários locos anônimos no
125 genoma utilizando iniciadores de sequencia arbitrária (WILLIAMS *et al.*, 1990).

126 Poucos trabalhos avaliaram a variabilidade molecular com genótipos brasileiros de
127 pinhão manso (ROSADO *et al.*, 2010; SANTOS *et al.*, 2010). Embora Rosado *et al.* (2010)
128 tenha realizado uma análise do banco de germoplasma da Embrapa, com mais de 190 acessos
129 representando as regiões brasileiras, nenhum acesso era do estado do Amazonas. Sinalizou-se
130 na maioria dos estudos moleculares base genética estreita para a espécie *J. curcas*.

131 No município de Itacoatiara–AM, existem plantios de “*Jatropha*” desde 2007, oriundos de
132 sementes e estacas de árvores de procedência local e de sementes adquiridas no estado do
133 Maranhão. Em 2009, ao se iniciar um programa de melhoramento no município, foi delineado
134 um ensaio com 36 progênies, compostas por estes acessos e outros oriundos do programa de
135 melhoramento da Embrapa – RO. Com o intuito de se averiguar a variabilidade genética,
136 foram incorporadas a este estudo amostras de DNA de plantas do Mato Grosso, do Paraguai e
137 da Costa Rica.

138 Desse modo, objetivou-se realizar a caracterização molecular por RAPD de acessos de
139 pinhão-manso encontrados no município de Itacoatiara –AM e de outras regiões, a fim de se
140 investigar a diversidade genética.

141 MATERIAL E MÉTODOS

142 Foram utilizados 90 acessos de pinhão manso dos quais 21 acessos foram procedentes do
143 estado do Maranhão – porém plantados em Itacoatiara; 22 com origem (local) no município
144 de Itacoatiara; 17 procedentes de Porto Velho, cedidos pela Embrapa Rondônia (dos quais
145 sete foram plantado em Itacoatiara); 20 do município de Rio Pardo – MS, sete oriundos do
146 Paraguai e três da Costa Rica - sendo estas três últimas procedências doadas pela empresa Rio

147 Pardo Bioenergia Ltda. A identificação dos acessos e caracterização de suas procedências
148 encontram-se descritas na Tabela 1.

149 As extrações e amplificações de DNA foram realizadas no Laboratório de Evolução
150 Aplicada da Universidade Federal do Amazonas, em Manaus. Amostras de folhas de cada
151 acesso foram maceradas no ruptor e homogenizador Precells 24 (Bertin Technologies, USA)
152 com programação de 5000 rpm 1x10 segundos. O DNA foi extraído com Kit de extração -
153 DNAsy Mini Plant kit (Promega) utilizando-se 30 mg de folha e pelo método de CTAB 2%
154 utilizando-se 60 mg de folha (DOYLE & DOYLE, 1990).

155 Para a seleção de iniciadores (*primers*), quatro amostras de DNA de diferentes localidades
156 foram utilizadas para uma triagem de polimorfismo com 12 iniciadores. Seis dos doze
157 iniciadores testados foram selecionados por apresentarem boa resolução e maior número de
158 bandas, estão identificados por um asterisco na (Tabela 2). Os *primers* selecionados foram
159 sintetizados pela Operon Technologies, USA.

160 As reações de PCR foram baseadas em Williams *et al.* (1990), com modificações, após
161 testes de otimização na reação de amplificação. As reações de amplificação foram conduzidas
162 em Termociclador Eppendorf em um volume total de 30 µl, que continha 20 ng de DNA
163 genômico (5ng/2µl), 250 µM de dNTP (2,5mM), 3mM de MgCl₂ (25mM), 50 ng do iniciador
164 (10ng/µl), 1,5 U de enzima Taq polimerase (Biotech Amazon, Amazonas, Brasil), 3 µl de
165 solução tampão 1X (Tris-HCl 200 mM pH=8,6; KCl 500 mM) e 11,8µl de água ultra pura. As
166 reações foram submetidas a 1: 2 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 36°C e 2 min a 72°C, e 33
167 ciclos de 10 s a 94° C, 20 s a 40° C, 2 min a 72°C, mais uma etapa de 10 min a 72° C. A
168 otimização da temperatura de anelamento dos iniciadores selecionados realizou-se a partir de
169 testes com o programa RAPD1, onde houve variação somente da temperatura de anelamento
170 para 40°C, 45°C e 50°C (para este ensaio utilizou-se uma amostra de DNA). Os produtos da
171 amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,5 % em solução tampão
172 TBE1X a 120 V por 4 horas, corados com brometo de etídio de 0,5 mg/ml, visualizados em
173 Fotodocumentador Easy Doc (Biagency). Os géis continham 32 amostras de pinhão manso,
174 dois controles e dois marcadores de peso molecular (1 Kb ladder, Fermentas) estão nas
175 extremidades dos géis.

176 A avaliação de cada *primer* foi feita três vezes e aqueles que apresentaram
177 reprodutibilidade foram considerados na análise. Fez-se a codificação dicotômica na avaliação

178 dos géis, em presença (1) e ausência (0) da banda. A matriz de dissimilaridade foi construída
179 com o complemento aritmético do índice de Jaccard. Para o agrupamento empregou-se a
180 técnica UPGMA (Ligação Média Entre Grupos), método de otimização de Tocher e projeção
181 tridimensional. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa GENES
182 (CRUZ, 2006).

183 **RESULTADOS e DISCUSSÃO**

184 Obteve-se em média 5 µg de DNA com kit de extração (Figura 1) e 2 µg com o método
185 CTAB 2%.

186 Os seis *primers* RAPD amplificaram 110 bandas com média de 18,3 por iniciador
187 (Tabela 3). Destas bandas, apenas duas foram monomórficas para os 90 acessos, as quais
188 estão indicadas com setas cheias no iniciador ONP19 (APÊNDICE B), o número de bandas
189 polimórficas representa 98,18% do total obtido. Estes *primers* também foram polimórficos em
190 Rosado *et al.* (2010), com exceção do *primer* OPAX06, não utilizado por estes autores.
191 Resultado semelhante foi encontrado por Ram *et al.* (2008), ao analisarem a diversidade
192 genética de diferentes espécies de *Jatropha* com marcador RAPD, no qual obtiveram 80,2%
193 de polimorfismo. Já Quintero *et al.* (2011) obtiveram 90% de bandas polimórficas em um
194 estudo com 88 acessos de *J. curcas* oriundos do México, no entantousando marcadores AFLP.
195 Kumar *et al.* (2009) estudando a diversidade genética entre 26 acessos de *Jatropha curcas* L.
196 utilizando dados de RAPD concluíram que esse marcador pode ser utilizado para estimar as
197 relações genéticas entre acessos e auxiliar na caracterização dos mesmos.

198 O número de bandas detectadas variou de oito a vinte e quatro por *primer*. O *primer*
199 OPJ20 (Figura 2) gerou o segundo maior número de bandas (23), mas foi o que apresentou o
200 menor índice de diversidade (0,447) (Tabela 3). Ao contrário, o *primer* OPN19 gerou apenas
201 oito bandas (Figura 3), mas gerou maior diversidade (0,670). O *primer* OPAX06 gerou 21
202 bandas (Figura 4), porém com pouca diversidade. O *primer* OPV14 gerou o maior número de
203 bandas, totalizando 24 bandas (Figura 5). O *primer* OPA11 gerou 18 bandas (Figura 6) e o
204 *primer* OPV18 gerou 16 bandas (Figura 7).

205 Os iniciadores OPJ20, OPN19 e OPV14 foram reprodutíveis para todos os acessos
206 estudados. Já os iniciadores OPAX06 e OPV18 foram reprodutíveis em 87 acessos e OPA11
207 em 73 deles, apresentando a menor reprodutibilidade. A presença de bandas variou de 0,388
208 (OPA11) a 0,764 (OPN19), enquanto que a ausência de bandas ficou entre 0,236 (OPN19) a

209 0,612 (OPA11) na Tabela 3. Em Rosado *et al.* (2010) apenas os marcadores OPN19 e OPV18
210 não foram reprodutíveis para os 192 acessos utilizados.

211 O marcador OPN19 se apresentou mais frequente, logo sua sequência foi a mais comum
212 encontrada nos acessos, entretanto o marcador OPA11 foi o menos frequente e sequência
213 mais rara entre os acessos. Em Rosado *et al.* (2010) os marcadores OPJ20 e OPV18 foram os
214 mais frequentes com 0,979 e 0,948 respectivamente, os menos frequentes foram OPV14 com
215 0,021 e OPA11 com frequência 0,266. De modo similar o marcador OPA11 também foi
216 menos frequente neste estudo realizado. O marcador OPN19 apresentou 0,764 de frequência
217 de presença de bandas, valor este próximo ao encontrado em Rosado *et al.* (2010), que foi de
218 0,754.

219 A Figura 8 exibe o agrupamento UPGMA e a Figura 9 a projeção tridimensional (3D) dos
220 90 acessos, mostrando que não houve agrupamento específico por origem geográfica. A
221 literatura tem relatado a estreita base genética da espécie *Jatropha curcas* tanto com acessos
222 nacionais (ROSADO *et al.* 2010) quanto com acessos de outros países (KUMAR *et al.*, 2009;
223 PAMIDIMARRI *et al.*, 2009; SUBRAMANYAM *et al.*, 2009). Os baixos níveis de
224 diversidade genética do pinhão manso em muitos países têm sido explicados pela provável
225 dispersão de espécies nativas do México e da América do Sul pelos portugueses para ilhas de
226 Cabo Verde e Guiné-Bissau para outros países da África e da Ásia (HELLER, 1996). Na
227 Tailândia, os baixos níveis de diversidade reforçam a hipótese que o pinhão manso foi
228 introduzido pelos portugueses e multiplicados via propagação vegetativa possivelmente a
229 partir de poucos genótipos (RATREE, 2004). Na Índia, a base genética estreita tem sido
230 atribuída ao pequeno número de plantas introduzidas e sua propagação vegetativa,
231 considerando que o mesmo processo possa ter ocorrido na China (SUN *et al.*, 2008).

232 À semelhança dos agrupamentos UPGMA e projeção 3D, o método de otimização de
233 Tocher não criou grupos com base na expectativa de separação por localidade/região. O
234 método resultou a formação de 17 grupos mutuamente exclusivos (Tabela. 4). Os acessos
235 costarriquenhos e paraguaios foram alocados comumente em grupos de acessos nacionais. A
236 definição do local de origem da distribuição da espécie *Jatropha* ainda tem sido alvo de
237 estudos, no entanto, existe uma forte concordância que o seu centro de origem é no México e
238 no continente América Central (SUJATHA *et al.*, 2008).

239 Para Rosado *et al.* (2010) a formação de grupos divergentes em *J. curcas* com acessos do
240 Brasil não está relacionada com origem geográfica e que acessos de diferentes regiões podem
241 ter a mesma origem genética. Basha & Sujatha (2007) avaliando genótipos de diferentes
242 regiões da Índia, a partir de marcadores RAPD e ISSR, verificaram que dos 43 genótipos,
243 83% foram agrupados em dois grandes grupos, indicando que também na Índia a diferença
244 geográfica não é sinônimo de divergência genética. Freitas *et al.* (2011) chegaram a mesma
245 conclusão, uma vez que acessos com origens continentais diferentes formaram um mesmo
246 grupo. Porém Santos *et al.* (2010), em um estudo com acessos “brasileiros”, provenientes de
247 Triunfo - PB, Quixeramobim - CE, Bebedouro – SP, Janaúba – MG, Pará – PA, Juazeiro –
248 BA e Petrolina- PE e, dos países, República Dominicana, Tanzânia e Paraguai, observaram a
249 conformação de alguns grupos em função da origem geográfica.

250 Mesmo considerando a estreita base genética desta oleaginosa, a variabilidade genética
251 existente pode ser explorada nos programas de melhoramento a partir de cruzamentos entre
252 indivíduos de grupos distintos (Laviola *et al.*, 2010), bem como introduzir novos genótipos às
253 coleções de trabalho para ampliá-la.

254

255 **CONCLUSÕES**

256 Os marcadores RAPD revelaram ser eficientes quanto à caracterização molecular e sobre
257 a avaliação da (dis)similaridade do pinhão manso.

258 Embora a diversidade genética não seja definida pela origem geográfica, constatou-se a
259 existência de variabilidade genética entre os acessos de pinhão manso estudados.

260

261

262

263

264

265

266

267 **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- 268 BASHA, S. D.; SUJATHA, M. Inter and intra-population variability of *Jatropha curcas* (L.)
269 characterized by RAPD and ISSR markers and development of population-specific SCAR
270 markers. **Euphytica**, Wageningen, v. 156, p.375-386, mar. 2007.
- 271 BASHA, S. D.; FRANCIS, G.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K.; SUJATHA, M. A
272 comparative study of biochemical traits and molecular markers for assessment of genetic
273 relationships between *Jatropha curcas* L. germplasm from different countries. **Plant Science**,
274 Limerick, v. 176, p.812-823, mar. 2009.
- 275 BORÉM, A.; CAIXETA, E. T.; Aplicação dos Marcadores Moleculares no Melhoramento.
276 In: **Marcadores Moleculares**. Viçosa: UFV, 2009. p. 99-105.
- 277 BUENO, L. C. DE S.; MENDES, A. N. G.; CARVALHO, S. P. Banco de Germoplasma.
278 In: _____ **Melhoramento genético de plantas: princípios e procedimentos**. Minas Gerais:
279 UFLA, 2001. p. 40-44.
- 280 CRUZ, C. D.; **Programa GENES: análise multivariada e simulação**. Viçosa: UFV, 2006.
281 175p.
- 282 DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v. 12, p. 13-15,
283 1990.
- 284 FRANCIS, G.; EDINGER, R.; BECKER, K. A concept for simultaneous wasteland
285 reclamation, fuel production, and socio-economic development in degraded areas in India:
286 need, potential and perspectives of *Jatropha* plantations. **Natural Resources Forum**, Paris, v.
287 29, p. 12-24, 2005.
- 288 FREITAS, R. G.; MISSIO, R. F.; MATOS, F. S.; RESENDE, M. D. V.; DIAS, L. A. S.
289 Genetic evaluation of *Jatropha curcas*: an important oilseed for biodiesel production.
290 **Genetics and Molecular Research**, v. 10, n.3, p. 1490-1498, jul. 2011.
- 291 HELLER; J. Physic nut, *Jatropha curcas* L.: Promoting the conservation and use of
292 underutilized and neglected crops 1. **International Plant Genetic Resource Institute**, 1996.
293 66p.
- 294 KUMAR, R.V.; TRIPATHI, Y.K; SHUKLA, P.; AHLAWAT, S.P.; GUPTA, V.K. Genetic
295 diversity and relationships among germplasm of *Jatropha curcas* L. revealed by RAPDs.
296 **Trees**, v. 23, p. 1075-1079, 2009.
- 297 LAVIOLA, B. G.; BHERING, L. L.; ALBRECHT, J. C.; MARQUES, S. S.; ROSADO, T. B.
298 Caracterização morfo-agronômica do banco de germoplasma de pinhão manso. In:
299 CONGRESSO BRASILEIRO DE PLANTAS OLEAGINOSAS, ÓLEOS, GORDURAS E
300 BIODIESEL, 6., 2009, Montes Claros. Anais... Lavras: UFLA, 2009. 6. OK
- 301 LAVIOLA, B. G.; ROSADO, T. B.; BHERING, L. L., KOBAYASHI, A. K.; RESENDE, M.
302 D. V. Genetic parameters and variability in physic nut accessions during early developmental
303 stages. **Pesq. agropec. bras.**, v.45, p.1117-1123, 2010.

- 304 OLIVEIRA, V. D.; **Variabilidade genética de pinhão manso cultivado em dois**
305 **Agroecossistemas de Sergipe**. 2010. 45 f. Dissertação (Mestrado em Agroecossistemas) -
306 Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, Sergipe, 2010.
- 307 PAMIDIAMARRI, D. V. N. S.; PANDYA, N; REDDY, M. P.; RADHAKRISHNAN, T.
308 Comparative study of interspecific genetic divergence and phylogenetic analysis of genus
309 *Jatropha* by RAPD and AFLP. **Molecular Biology Reports**, Dordrecht, v.36, p. 901-907,
310 2009.
- 311 QUINTERO, V.P.; LÓPEZ, J.L.A.; COLMENERO A.Z.; GARCÍA N.M.; COLÍN, C.A.N.
312 BONILLA, J.L.S.; RANGEL, M.R.A.; LANGARICA, H.R.G. Molecular characterization of
313 *Jatropha curcas* L. genetic resources from Chiapas, México through AFLP markers. **Biomass**
314 **& Bioenergy**, v.35, p.1897-1905, 2011.
- 315 RAM, S.G. *et al.* Genetic diversity among *Jatropha* species as revealed by RAPD markers.
316 **Genetics Resources and Crop Evolution**, v. 55, p. 803-809, 2008.
- 317 RATREE, S. A. Preliminary study on physic nut (*Jatropha curcas* L.) in Thailand. **Pakistan**
318 **Journal of Biological Sciences**, Faisalabad, Pakistan, v. 7, p. 1620-1623, 2004.
- 319 ROSADO, T. B., LAVIOLA B. G.; FARIA D. A.; PAPPAS M. R.; BHERING L. L.,
320 QUIRINO B.; GRATTAPAGLI D.. Molecular markers reveal limited genetic diversity in a
321 large germplasm collection of the biofuel crop *Jatropha curcas* L. in Brazil. **Crop Science**, v.
322 50, p. 2372-2382, 2010.
- 323 SANTOS C. A. F. , DRUMOND M. A; RODRIGUES M. A.; EVANGELISTA M. R. V.
324 Genetic similarity of *Jatropha curcas* accessions based on AFLP markers. **Crop Breeding**
325 **and Applied Biotechnology**, v.10, p.364-369, 2010.
- 326 SUBRAMANYAM, K.; MURALIDHARARAO, D.; DEVANNA, N. Genetic diversity
327 assessment of wild and cultivated varieties of *Jatropha curcas* (L.) in India by RAPD
328 analysis. **African Journal of Biotechnology**. v. 8, p. 1900–1910, 2009.
- 329 SUJATHA M.; REDDY T. P.; MAHASI M. Role of biotechnological interventions in the
330 improvement of castor (*Ricinus communis* L.) and *Jatropha curcas* L. **Biotechnol. Adv.** v. 26,
331 p. 424–435, 2008.
- 332 SUN, Q. B.; LI, L. F.; WC, G. J.; GE, X.- J. SSR and AFLP, markers reveal low genetic
333 diversity in the biofuel plant *Jatropha curcas* in China. **Crop Science**. Madison, v. 48, p.
334 1865-1870, 2008.
- 335 SUNIL, N.; SUJATHA, M.; KUMAR, V.; VANAJA, M.; BASHA, S.D.; VARAPRASAD,
336 K.S. Correlating the phenotypic and molecular diversity in *Jatropha curcas* L. **Biomass &**
337 **Bioenergy**, India, v. 35, p. 1085-1096, 2011.
- 338 WILLIAMS, J. G. K., KUBELIK, A. R., LIVAK, K. J., RAFALSKI, J. A. & TINGEY, S. V.
339 DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful genetic markers. **Nucleic**
340 **Acids Research**, v.18, n.22, p.6531–6535, nov. 1990.

Tabela 1 – Identificação e caracterização dos 90 acessos de pinhão manso em relação a sua procedência.

Nº	Código	Procedência	Caracterização do acesso	Nº	Código	Procedência	Caracterização do acesso
1	Jc 01	Maranhão	1	46	Ita36	Itacoatiara – AM	4
2	Jc 02	Itacoatiara -AM	2	47	Ita37	Itacoatiara – AM	4
3	Jc 03	Porto Velho – RO	3	48	Ita38	Itacoatiara – AM	4
4	Jc 04	Maranhão	1	49	Ita39	Itacoatiara – AM	4
5	Jc 05	Maranhão	1	50	Ita50	Maranhão	5
6	Jc 06	Itacoatiara – AM	2	51	Rp01	Rio Pardo – MS	6
7	Jc 07	Porto Velho – RO	3	52	Rp03	Rio Pardo – MS	6
8	Jc 08	Itacoatiara – AM	1	53	Rp06	Rio Pardo – MS	6
9	Jc 09	Itacoatiara – AM	1	54	Rp11	Rio Pardo – MS	6
10	Jc 10	Maranhão	2	55	Rp12	Rio Pardo – MS	6
11	Jc 11	Maranhão	2	56	Rp13	Rio Pardo – MS	6
12	Jc 12	Itacoatiara – AM	1	57	Rp14	Rio Pardo – MS	6
13	Jc 13	Maranhão	2	58	Rp16	Rio Pardo – MS	6
14	Jc 14	Itacoatiara – AM	1	59	Rp17	Rio Pardo – MS	6
15	Jc 15	Maranhão	2	60	Rp18	Rio Pardo – MS	6
16	Jc 16	Itacoatiara – AM	1	61	Rp19	Rio Pardo – MS	6
17	Jc 17	Porto Velho – RO	3	62	Rp20	Rio Pardo – MS	6
18	Jc 18	Itacoatiara – AM	1	63	Rp21	Rio Pardo – MS	6
19	Jc 19	Porto Velho – RO	3	64	Rp22	Rio Pardo – MS	6
20	Jc 20	Porto Velho – RO	3	65	Rp24	Rio Pardo – MS	6
21	Jc 21	Maranhão	2	66	Rp26	Rio Pardo – MS	6
22	Jc 22	Porto Velho – RO	3	67	Rp27	Rio Pardo – MS	6
23	Jc 23	Itacoatiara – AM	1	68	Rp35	Rio Pardo – MS	6
24	Jc 24	Porto Velho – RO	3	69	Rp36	Rio Pardo – MS	6
25	Jc 25	Maranhão	2	70	Rp47	Rio Pardo – MS	6
26	Jc 26	Maranhão	2	71	Par01	Paraguai	7
27	Jc 27	Maranhão	2	72	Par02	Paraguai	7
28	Jc 28	Itacoatiara – AM	1	73	Par03	Paraguai	7
29	Jc 29	Itacoatiara – AM	1	74	Par04	Paraguai	7
30	Jc 30	Maranhão	2	75	Par05	Paraguai	7
31	Ita02	Itacoatiara – AM	4	76	Par06	Paraguai	7
32	Ita06	Itacoatiara – AM	4	77	Par07	Paraguai	7
33	Ita07	Itacoatiara – AM	4	78	Cs02	Costa Rica	8
34	Ita08	Itacoatiara – AM	4	79	Cs03	Costa Rica	8
35	Ita09	Itacoatiara – AM	4	80	Cs04	Costa Rica	8
36	Ita10	Itacoatiara – AM	4	81	Emb2	Porto Velho – RO	9
37	Ita13	Maranhão	5	82	Emb4	Porto Velho – RO	9
38	Ita14	Maranhão	5	83	Emb11	Porto Velho – RO	9
39	Ita15	Maranhão	5	84	Emb15	Porto Velho – RO	9
40	Ita16	Maranhão	5	85	Emb17	Porto Velho – RO	9
41	Ita19	Maranhão	5	86	Emb21	Porto Velho – RO	9
42	Ita20	Maranhão	5	87	Emb24	Porto Velho – RO	9

<i>Continua...</i>							
<i>Continuação...</i>							
43	Ita21	Maranhão	5	88	Emb28	Porto Velho – RO	9
44	Ita29	Itacoatiara – AM	4	89	Emb29	Porto Velho – RO	9
45	Ita31	Maranhão	5	90	Emb30	Porto Velho – RO	9

341 1 – Acesso plantado em Itacoatiara – AM, cuja planta-avó é procedência do Maranhão; 2 – Acesso plantado em
342 Itacoatiara – AM, cuja planta-avó é procedência de Itacoatiara – AM; 3 – Acesso plantado em Itacoatiara – AM,
343 cuja planta-avó é procedência de Porto Velho – RO; 4 – Acesso plantado em Itacoatiara – AM, cuja planta-mãe é
344 procedência de Itacoatiara – AM; 5 – Acesso plantado em Itacoatiara, cuja planta-mãe é procedência do Maranhão;
345 6 – Acesso plantado em Rio Pardo – MS, de mesma procedência; 7 – Acesso plantado em Rio Pardo – MS, cuja
346 procedência é o Paraguai; 8 – Acesso plantado em Rio Pardo – MS, cuja procedência é a Costa Rica; 9 – Acesso
347 plantado em Porto Velho – RO, de mesma procedência.

Tabela 2. Iniciadores utilizados para a triagem e suas respectivas sequencias de bases.

Iniciador	Sequencia (5'- 3')
OPR19*	CCTCCTCATC
OPV18*	TGGTGGCGTT
OPP1	GTAGCACTCC
OPT14	AATGCCGCAG
OPJ20*	AAGCGGCCTC
OPO2	ACGTAGCGTC
OPA11*	CAATCGCCGT
OPC14	TGCGTGCTTG
OPC18	TGAGTGGGTG
OPAX06*	AGGCATCGTG
OPN19	GTCCGTA CTG
OPV14*	AGATCCCGCC

* Seis iniciadores selecionados para as reações.

348

349

350

351

352

353

354

355

356

357

358

359

360

361

362

363

364

Tabela 3 – Perfil de resultados com amplificação das 90 amostras de pinhão manso. Iniciador, Sequência dos iniciadores, número de bandas geradas, reprodutibilidade do iniciador, frequência de presença e ausência do marcador RAPD e índice de diversidade.

Iniciador	Sequencia (5' - 3')	Nº de bandas	R	P	(1 - P)	Índice de Diversidade
OPJ20	AAGCGGCCTC	23	90	0,625	0,375	0,447
OPN19	CCTCCTCATC	8	90	0,764	0,236	0,670
OPAX06	AGGCATCGTG	21	87	0,407	0,593	0,460
OPV14	AGATCCCGCC	24	90	0,512	0,488	0,614
OPA11	CAATCGCCGT	18	73	0,388	0,612	0,257
OPV18	TGGTGCGTT	16	87	0,618	0,382	0,625

365 **R**=Reprodutibilidade do iniciador; **P**= frequência de presença de bandas RAPD; **(1-P)**= frequência de ausência
366 de bandas RAPD.

367

368

369

370

371

372

373

374

375

376

377

378

379

380

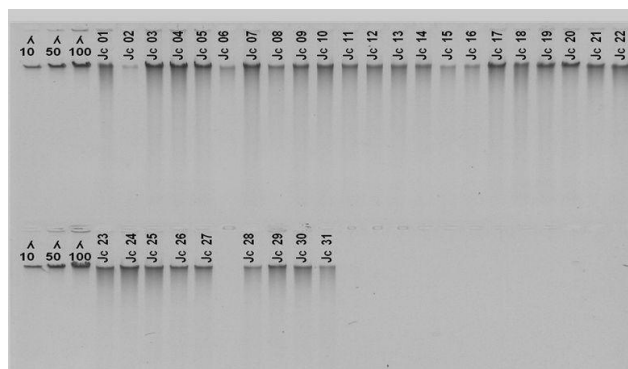
381

382

Tabela 4 - Agrupamento pelo método de otimização de Tocher de 90 acessos de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) procedentes do Brasil, Paraguai e Costa Rica.

Grupo	Acessos [#]
1	Ita15 Rp26 Rp35 Ita50 Par05 Rp11 Rp12 Rp36 Rp27 Ita16 Ita39 Rp13 Rp18 Rp19 Rp14 Rp17 Rp16 Rp20 Rp21 Emb02 Cs02 Par01 Cs03 Cs04 Emb04 Par07 Rp47 Par03 Emb29 Emb30 Rp01 Emb28 Emb21 Emb24 Emb11 Rp06 Par02 Par06 Ro03 Rp24 Par04
2	Jc01 Jc02 Jc03 Jc23
3	Jc04 Jc05 Jc06 Jc24 Ita07
4	Jc07 Jc15 Jc20
5	Jc08 Jc10 Jc12
6	Jc09 Jc11 Jc14 Jc28
7	Jc13 Jc19 Emb15
8	Jc16 Jc17 Jc26 Ita10
9	Jc18 Jc27 Ita38
10	Jc21 Jc29 Ita06 Ita29 Rp22
11	Jc22 Jc25 Ita08 Ita21
12	Jc30 Ita09
13	Ita02 Ita14
14	Ita3 Ita20
15	Ita19 Ita36 Emb17
16	Ita31
17	Ita37

[#] A identificação dos acessos encontra-se na Tabela 1.



383
 384
 385
 386

Figura 1 - Quantificação do DNA genômico de pinhão manso, usando Kit de extração. A identificação da procedência dos acessos encontra-se na Tabela 1. Fonte: Alfaia (2012).

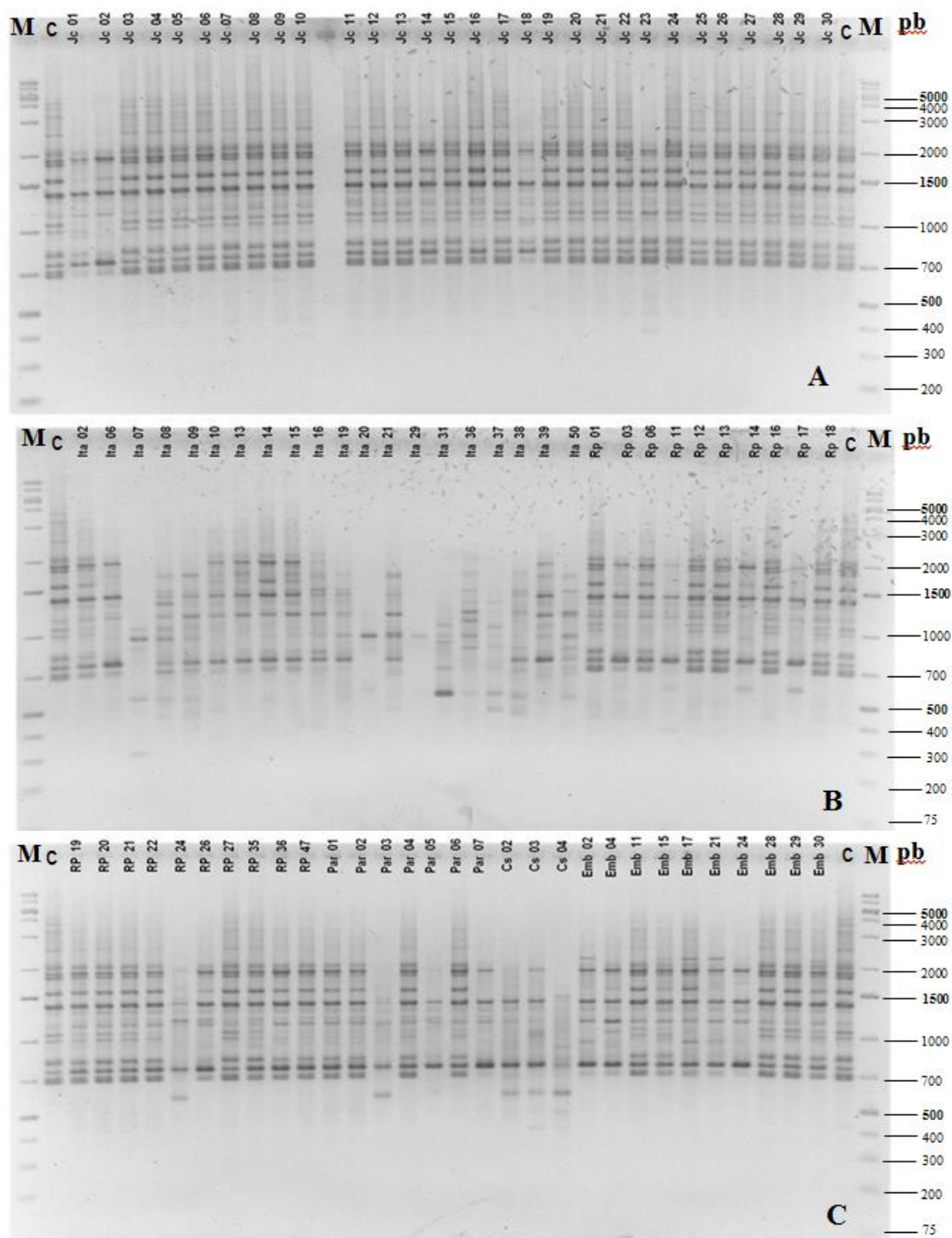


Figura 2 - Perfil eletroforético de DNA amplificado com o iniciador OPJ20. A gel 1, B gel 2 e C gel 3. M= Marcador 1 Kb Plus; c= controle; pb= pares de bases. A identificação da procedência dos acessos encontra-se na Tabela 1. Fonte: Alfaia (2012).

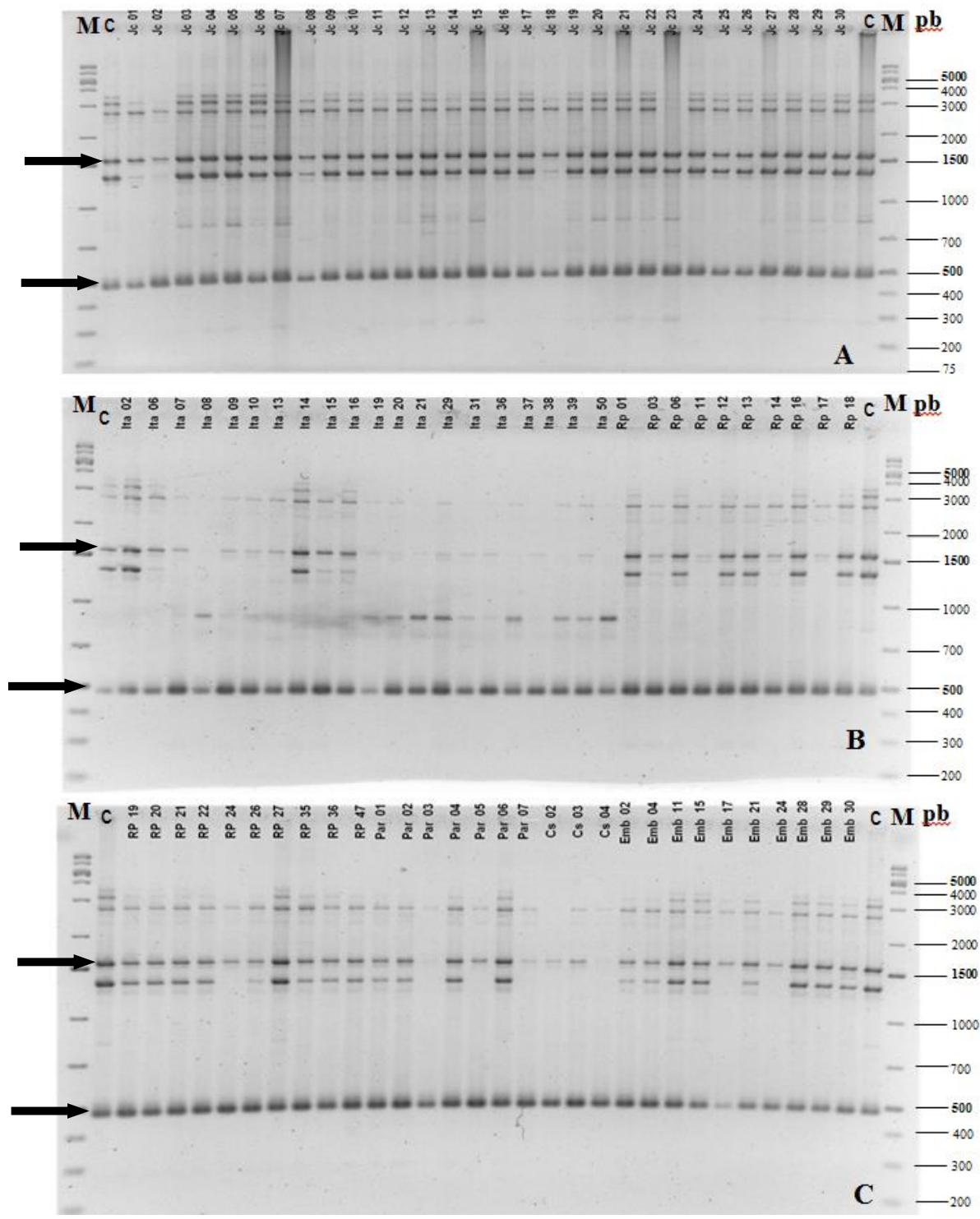


Figura 3 - Perfil eletroforético de DNA amplificado com o iniciador OPN19, **A** gel 1, **B** gel 2 e **C** gel 3. **M= Marcador 1 Kb Plus**; **c= controle**; **pb= pares de bases**. As setas indicam os perfis de bandas monomórficas. A identificação da procedência dos acessos encontra-se na Tabela 1. Fonte: Alfaia (2012).

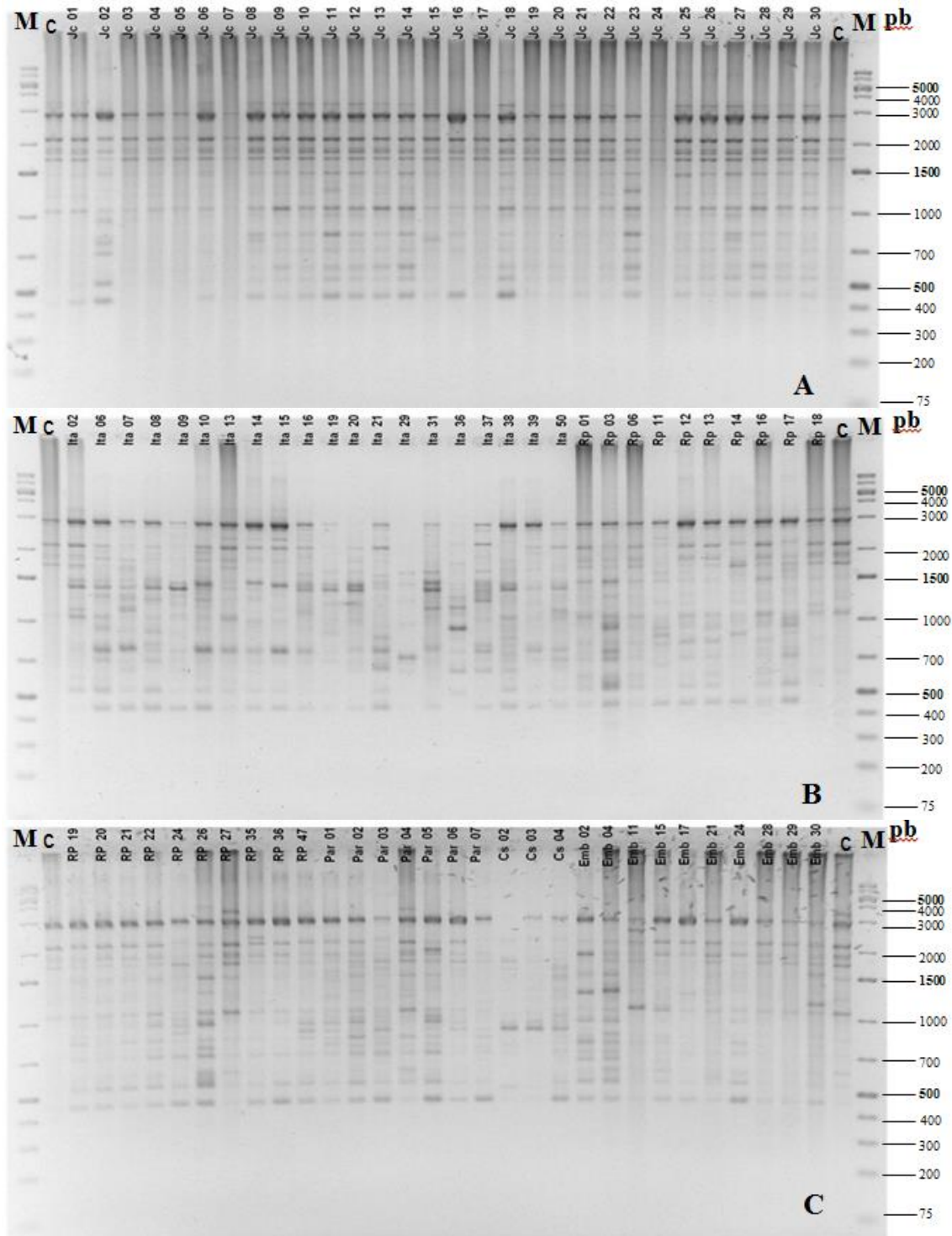


Figura 4 - Perfil eletroforético de DNA amplificado com o iniciador OPV14, **A** gel 1, **B** gel 2 e **C** gel 3. **M= Marcador 1 Kb Plus**; **c= controle**; **pb= pares de bases**. A identificação da procedência dos acessos encontra-se na Tabela 1. Fonte: Alfaia (2012).

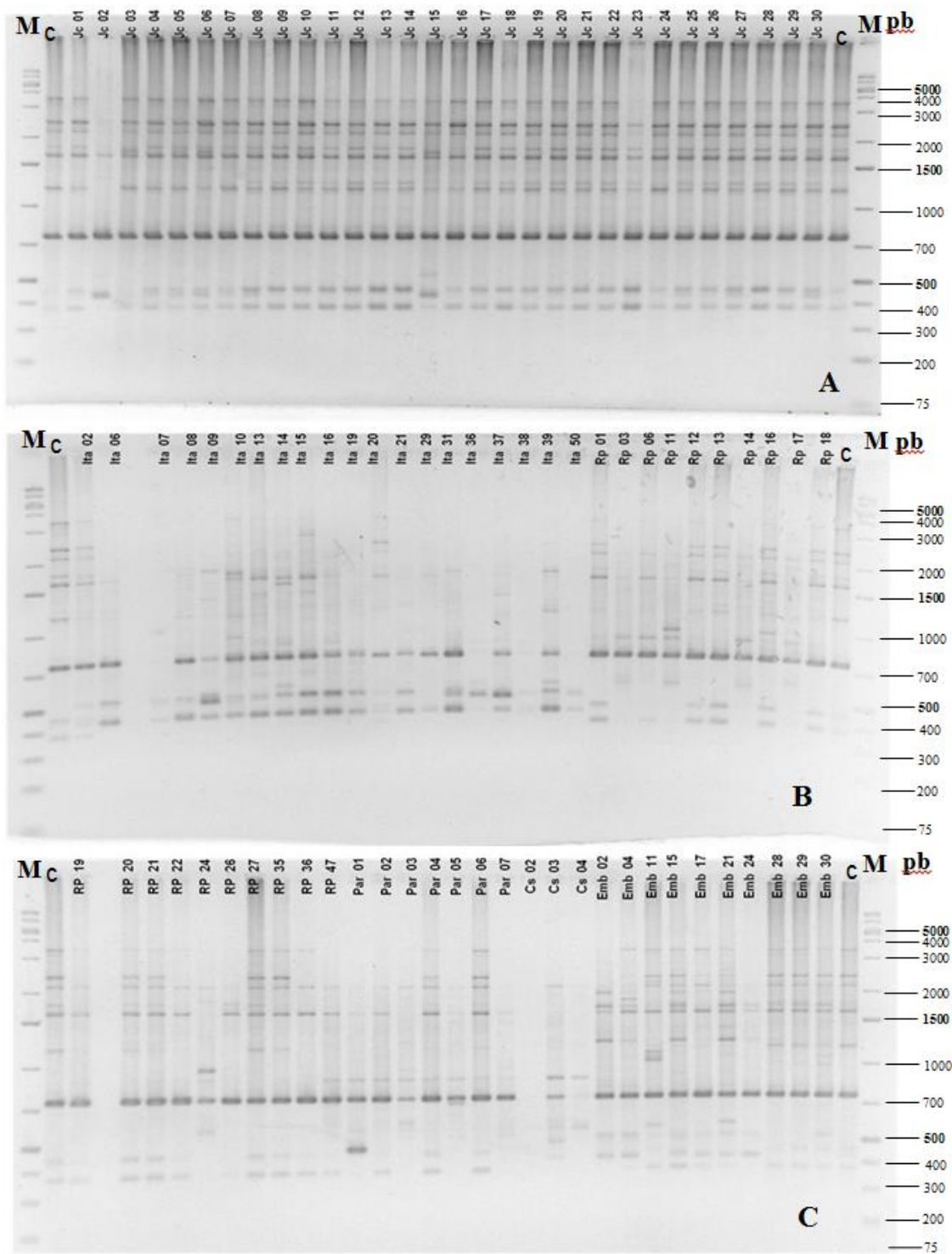


Figura 5 - Perfil eletroforético de DNA amplificado com o iniciador OPAX06, **A** gel 1, **B** gel 2 e **C** gel 3. **M= Marcador 1 Kb Plus**; **c= controle**; **pb= pares de bases**. A identificação da procedência dos acessos encontra-se na Tabela 1. Fonte: Alfaia (2012).

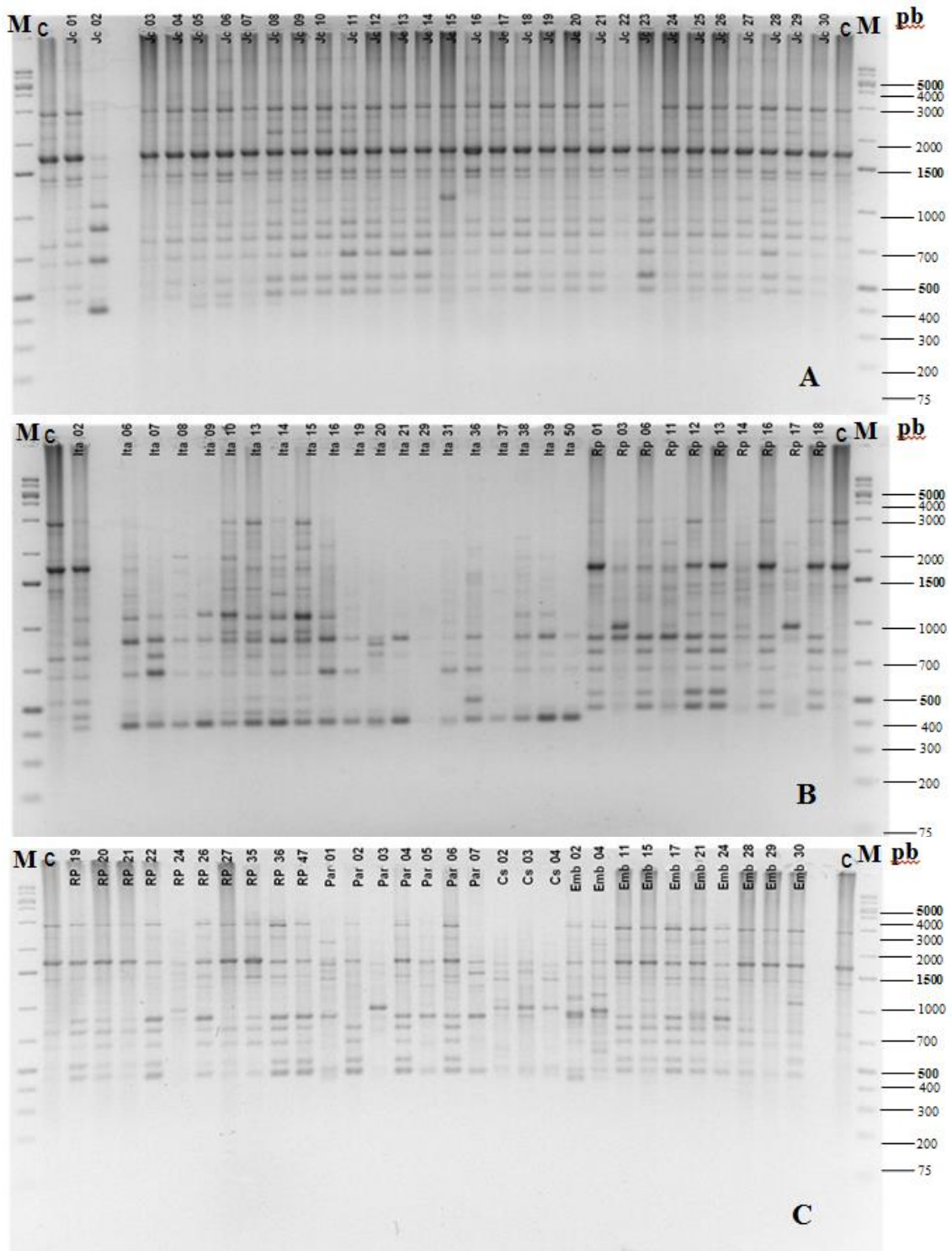


Figura 6 - Perfil eletroforético de DNA amplificado com o iniciador OPV18, **A** gel 1, **B** gel 2 e **C** gel 3. **M= Marcador 1 Kb Plus**; **c= controle**; **pb= pares de bases**. A identificação da procedência dos acessos encontra-se na Tabela 1. Fonte: Alfaia (2012).

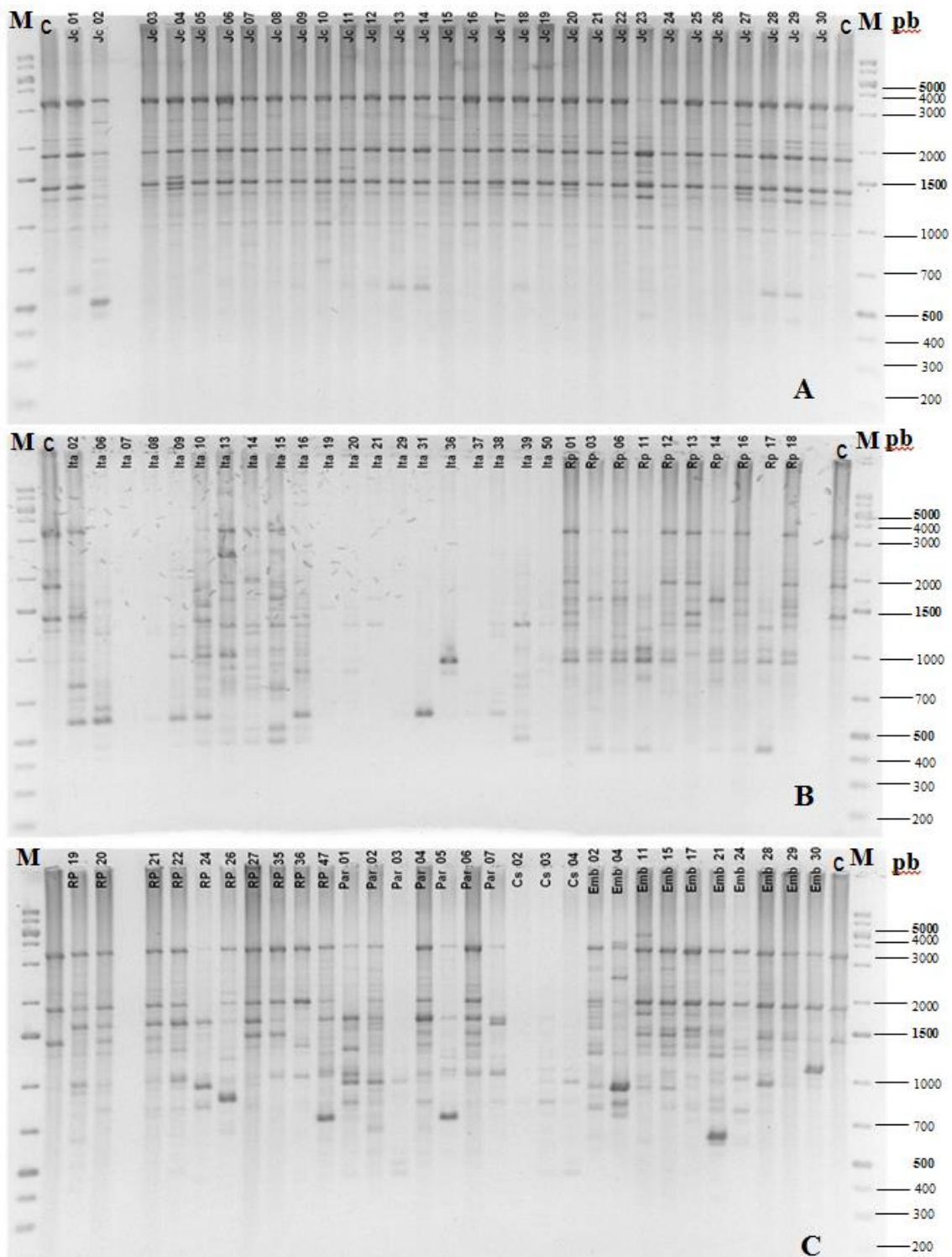


Figura 7 - Perfil eletroforético de DNA amplificado com o iniciador OPA11, **A** gel 1, **B** gel 2 e **C** gel 3. **M**= Marcador 1 Kb Plus; **c**= controle; **pb**= pares de bases. A identificação da procedência dos acessos encontra-se na Tabela 1. Fonte: Alfaia (2012).

387
388
389
390
391
392
393
394
395
396
397
398
399
400
401
402
403
404
405
406
407
408
409
410
411
412
413
414
415
416
417
418
419
420
421
422
423
424
425
426
427
428
429
430
431
432
433
434
435

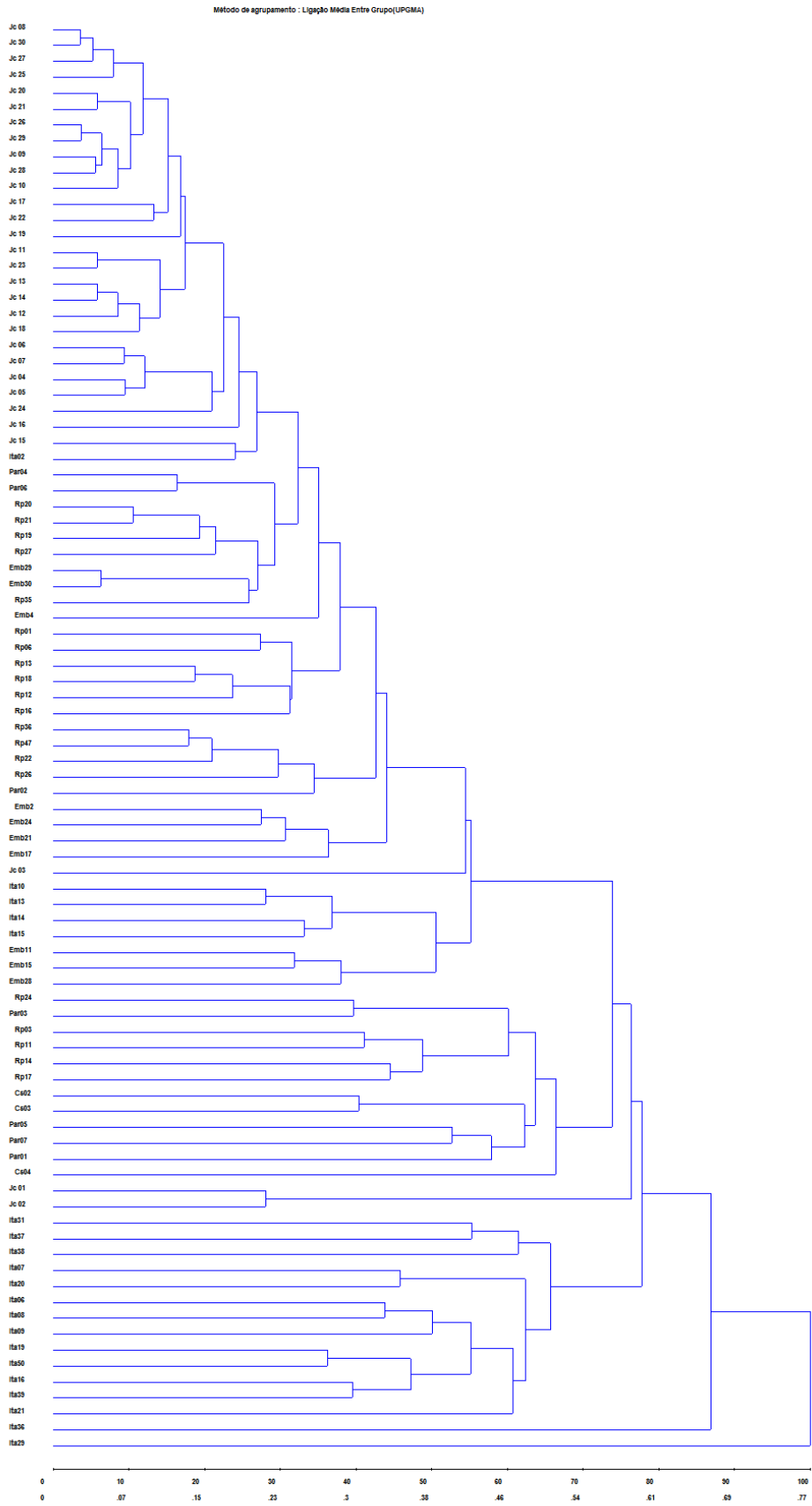
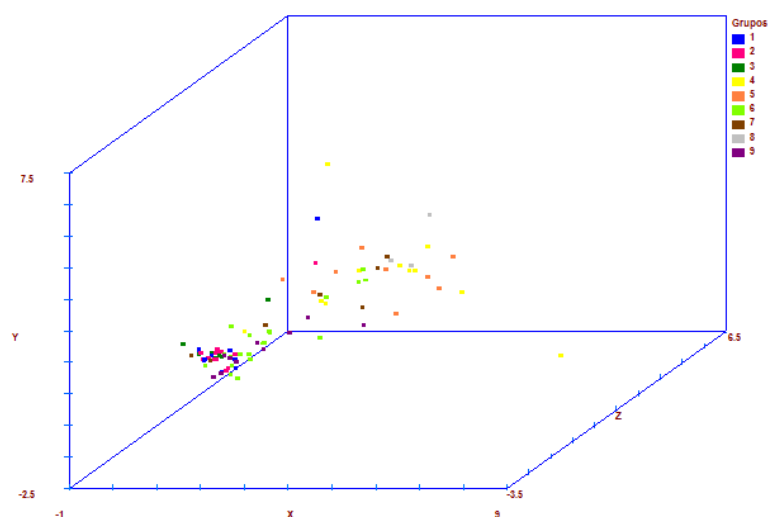


Figura 8 - Dendrograma UPGMA representando a diversidade molecular entre 90 acessos com procedência de regiões do Brasil, Costa Rica e Paraguai. Foi utilizado o complemento aritmético da medida de similaridade de Jaccard, para 110 marcas (apenas duas não polimórficas) a partir de seis *primers* RAPD.



436
 437
 438
 439
 440
 441
 442
 443
 444
 445
 446
 447
 448
 449
 450

Figura 9 - Projeção 3D para o agrupamento de acesso de pinhão manso de diferentes regiões. Legenda: Grupo 1 – Acesso plantado em Itacoatiara – AM, cuja planta-avó é procedência do Maranhão; Grupo 2 – Acesso plantado em Itacoatiara – AM, cuja planta-avó é procedência de Itacoatiara – AM; Grupo 3 – Acesso plantado em Itacoatiara – AM, cuja planta-avó é procedência de Porto Velho – RO; Grupo 4 – Acesso plantado em Itacoatiara – AM, cuja planta-mãe é procedência de Itacoatiara – AM; Grupo 5 – Acesso plantado em Itacoatiara, cuja planta-mãe é procedência do Maranhão; Grupo 6 – Acesso plantado em Rio Pardo – MS, de mesma procedência; Grupo 7 – Acesso plantado em Rio Pardo – MS, cuja procedência é o Paraguai; Grupo 8 – Acesso plantado em Rio Pardo – MS, cuja procedência é a Costa Rica; Grupo 9 – Acesso plantado em Porto Velho – RO, de mesma procedência.

451
 452