



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROECOSSISTEMAS**



VARIABILIDADE GENÉTICA DE PINHÃO MANSO CULTIVADO EM DOIS AGROECOSSISTEMAS DE SERGIPE

VANICE DIAS DE OLIVEIRA

2010

**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROECOSSISTEMAS**

VANICE DIAS DE OLIVEIRA

**VARIABILIDADE GENÉTICA DE PINHÃO MANSO CULTIVADO EM DOIS
AGROECOSSISTEMAS DE SERGIPE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Sergipe, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agroecossistemas, área de concentração Sistemas de Produção Sustentáveis, para obtenção do título de “Mestre”.

Orientadora

Dra. Ana da Silva Lédo

Co-Orientadora

Dra. Ana Veruska Cruz da Silva

**SÃO CRISTÓVÃO
SERGIPE - BRASIL**

2010

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**

O48v Oliveira, Vanice Dias de
Variabilidade genética de pinhão manso cultivado em dois agroecossistemas de Sergipe / Vanice Dias de Oliveira. – São Cristóvão, 2010.
iv, 33 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Agroecossistemas) – Programa de Pós-Graduação em Agroecossistemas, Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa, Universidade Federal de Sergipe, 2010.

Orientador: Dr^a. Ana da Silva Lédo
Co-orientador: Dr^a. Ana Veruska Cruz da Silva

1. Variedade genética. 2. Pinhão manso. 3. Biocombustível. 4. Desenvolvimento sustentável. I. Título.

CDU 582.682.1

VANICE DIAS DE OLIVEIRA

**VARIABILIDADE GENÉTICA DE PINHÃO MANSO CULTIVADO EM DOIS
AGROECOSSISTEMAS DE SERGIPE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Sergipe, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agroecossistemas, área de concentração Sustentabilidade de Agroecossistemas, para obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 18 de junho de 2010.

Dr. Pedro Roberto Almeida Viégas
DEA-NEREN-UFS

Dr. Leandro Eugenio Cardamone Diniz
Embrapa Tabuleiros Costeiros

Dra. Ana da Silva Léo
Embrapa Tabuleiros Costeiros/NEREN-UFS
(Orientadora)

**SÃO CRISTÓVÃO
SERGIPE - BRASIL**

“Toda teoria é cinza, e só é verde a árvore de dourados frutos, que é a vida”

WOLFGANG VON GOETHE

“A prática é o critério da verdade”

VLADIMIR LÊNIN

AGRADECIMENTOS

Ao **Supremo Arquiteto Demiurgo do Universo**, pelo dom da vida e da morte, pela chance concedida de “viver” novamente, e de me fazer perceber o seu palpitar incessante, em cada átomo, cada molécula, em cada rocha, planta, animal e pessoa.

Aos Mestres **Samael Aun Weor e Litelantes**, por todas as suas cátedras deixadas, principalmente as de Psicologia Revolucionária e Revolução da Dialética, que me fornecem impulso, força e compreensão para lutar e paulatinamente vencer as circunstâncias mais difíceis da vida e ao meu maior inimigo: eu mesma.

À **Dra. Ana Lédo**, pela orientação, apoio constante, mesmo mudando de área e de laboratório, pela paz+ciência, por ter dado o melhor, que tinha e que podia, para que este trabalho fosse realizado, e mais importante do que tudo isso, pelo seu equilíbrio e diplomacia.

À **Dra. Ana Veruska (Sininho)**, pelo apoio, pela tranquilidade, por usar sua varinha mágica para transformar o amargo em doce, o preto e branco do laboratório em colorido, o difícil em fácil, e tornar as pessoas mais metódicas, sistemáticas, perfeccionistas e rígidas em pessoas um pouco mais suaves e flexíveis. Obrigada fada encantada!

Ao **Dr. Leandro Diniz**, pelas sugestões, críticas, correções, mínimos detalhes ensinados, cobranças, mas especialmente pelas “broncas” e por mostrar meus erros e fraquezas, tão necessário para que me corrija, seja mais forte e amadureça. Agradeço-te, profundamente!

Ao **MSc. Doutor Hélio Wilson L. de Carvalho**, pelo incentivo, entusiasmo, pelo suporte nas viagens e nos campos, apoio constante, no que estava ao seu alcance, pelas informações cedidas, pelas aulas e discussões, pelos conselhos, pela força, carinho, amizade, por sempre acreditar e confiar em mim e por tantas outras coisas mais que aprendi contigo, nesses últimos quatro anos. Obrigada, grande pai!

Ao **Dr. Ivênio Rubens**, pelo incentivo, pela força, confiança, credibilidade, informações e materiais bibliográficos cedidos, suporte e apoio nas coletas.

Ao **Prof^o Dr. Pedro Viégas**, por aceitar participar de banca, contribuir de forma valiosa para a minha vida acadêmica e para melhoria do trabalho, e principalmente pelo nobre exemplo de humildade, tranquilidade e didática.

Ao técnico **Inácio Roque**, pelo suporte, apoio, mesmo mudando de laboratório, pela amizade, carinho, ouvidoria, conselhos, por ter sido a luz da compreensão e do discernimento, quando estas me faltaram nos momentos de mudança, pressão, estresse, insegura e medo, e, também, pelas aulas relaxantes de dança.

Aos X-Gen do Laboratório de Biologia Molecular: **Camila (ShadowCat)**, **Cássia (Jean Grey)**, **Gilvânia (Mística)**, **Isaac (Ciclope)**, **Julie (Vampira)**, **Lucas (Wolverine)**, **Silvio (NightCrawler)** e **Tati (Tempestade)**, pela torcida, apoio, ajuda, boa vontade e pelo excelente clima de cooperação e amizade no laboratório.

Aos propagadores da alegria do Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas: **Aline Sá**, **Dona Conceição**, **Micaele**, **Kícia**, **Lucas**, **Rodrigo** e **Zilná**, pela ajuda, apoio e torcida.

A **MSc. Luzia Tabosa** e seu esposo **Nilton**, pela companhia em muitas noites silenciosas no laboratório, pelo carinho, amizade, incentivo, confiança, boa vontade e ajuda.

A **Allívia Rouse**, pelas críticas, sugestões, correções, material bibliográfico enviado, por ter estado sempre disponível e com uma enorme paciência para ensinar e sanar minhas dúvidas. Obrigada mesmo, não teria conseguido sem você!

Aos colegas da turma de mestrado de 2008, especialmente **Juliano Lima**, **Thássia Barbosa**, **Maria Sales**, **Josenilton Sampaio** e **Helder Prudente**, por não me deixarem ir embora, pela amizade, companheirismo, ajuda e apoio nas circunstâncias mais difíceis.

Aos meus pais, **José e Yolanda**, por doarem suas vidas com amor e dedicação, para que eu tivesse a minha. Amo-vos!

Às minhas irmãs **Valéria, Vanessa e Vaneide**, pelo amor, união e apoio, especialmente, por terem cuidado de mainha e painho por mim, durante o mestrado. Amo vocês demais!

Aos meus amados sobrinhos **Enzo Guilherme, Ádler Augustus e Tírzah Maria**, pela inocência e alegria, que nos deixam mais felizes e leves. Lindos de titia!

Aos meus pais e instrutores **Carlos Antunes e Maria Claudina**, por se constituírem exemplos de amor incondicional, doado àqueles sem nenhum laço de sangue, e por terem sacrificado suas vidas para que eu tivesse uma nova chance de viver. A vocês, serei grata sempre, nessa existência e em vindouras!

Aos meus irmãos **Rafael, Bernardo e Leonardo Antunes**, por terem entrado em minha nova vida, dividirem comigo os seus pais e por todo carinho e amizade que nos une. Te amo maninhos!

A todos meus irmãos do Movimento Gnóstico de Antropologia de Aracaju, Neópolis, São Luís e Buenos Aires, em especial: **Dora, Elis, Eloá, Enilza, Patrícia, Maria e Marcelo, Helen, Rosi e Zé Carlos, Dhully e Jessé, Anunciação, Ailton, Deolando, Vera e Ivaney, Fábio e Gabriela, e Paula e Federico**. Por me apoiarem e estarem comigo nos momentos mais difíceis e dolorosos que passei nestes últimos anos. Um por todos e todos por um!

À **Dra. Semíramis Ramos** e ao **Dr. Joézio Anjos (Dr. Pesquisador-cientista-defendido)**, pelo incentivo e excelentes contribuições à minha vida profissional e pessoal no tempo em que estive trabalhando com vocês.

Ao **Dr. Adriano Márcio e Dr. José Guedes**, pelo incentivo, força, e por tudo que vocês me ensinaram em nossas conversas de almoço.

Aos funcionários da Embrapa Tabuleiros Costeiros que tive a grande oportunidade de conviver e aprender: **Liliane, Andréa, Cida, Lílian, Gislene Alencar, Dr. Cuenca, Alessandra, Samuel, Cleidson, Ricardo, Dra. Lourdes Leal, Joel, Kleber, Geovânia, Raquel, Roque, Zezinho, Liu, Figueirôa, Dr. Donald, Robson, Zé Ailton, Zé Raimundo, Arnaldo, Valdi, Juraci**.

Às adoráveis meninas da equipe de limpeza: **Gilvânia, Dona Gilvan, Marciane, Edleuza, Ana e Reinalda**, por usarem suas mãos fada para deixar nosso ambiente de trabalho mais harmonioso.

Aos meninos da segurança do dia: **Marcos, André, Jamisson e Wesley**, pela alegria em servir, e da noite: **Sidivan, Cristiano, Losângela e Jailson**, pela excelente companhia nas noites silenciosas e “solitárias” na Embrapa.

Ao **NEREN** pela oportunidade concedida e toda sua equipe de professores, especialmente aos professores **Pedro Viégas e Robério Anastácio**.

Às secretárias do NEREN, especialmente **Rogena**.

À **Fundação de Apoio à Pesquisa e à Inovação Tecnológica do Estado de Sergipe (FAPITEC)** pela concessão da bolsa.

E por fim, agradeço a todas as pessoas, que porventura tenha esquecido de citar, que contribuíram não somente na construção deste trabalho, mas que ajudaram a iluminar o caminho dessa minha existência!

MUITO OBRIGADA!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	ii
RESUMO	iii
ABSTRACT	iv
1- INTRODUÇÃO	1
2- REVISÃO DA LITERATURA.....	3
2.1- Desenvolvimento sustentável e os biocombustíveis.....	3
2.2. Aspectos gerais do pinhão manso	5
2.3. Aspectos agronômicos e produção de pinhão manso	7
2.4. Recursos genéticos de pinhão manso: conservação, caracterização e melhoramento	8
3 - MATERIAL E MÉTODOS	13
3.1 – Área de estudo e coleta de material vegetal.....	13
3.2 - Extração de DNA	15
3.3 - Amplificação do DNA genômico (RAPD).....	15
3.4 - Análise de dados moleculares e obtenção da similaridade genética	17
4- RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
5- CONCLUSÕES.....	27
6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1.** Mapa de Estado de Sergipe com a localização dos municípios de Carira e Umbaúba. Elaboração e diagramação: Alessandra Moraes – Laboratório de Geotecnologias Aplicadas, Embrapa Tabuleiros Costeiros.....13
- FIGURA 2.** A - Cultivo de pinhão manso, solteiro, no Campo Experimental de Umbaúba-SE, da Embrapa Tabuleiros Costeiros; B - consorciado com feijão comum; C- com milho e D - com girassol, no Assentamento Edmilson Oliveira, Carira-SE. Foto: Vanice Dias.....14
- FIGURA 3.** Padrões de bandejamento de indivíduos de pinhão manso obtidos, utilizando os *primers* B03 e A19. P – Padrão de peso molecular 1 kb; 1 a 20- Umbaúba; 21 a 40 - Carira e CN – Controle Negativo.....20
- FIGURA 4.** Dendograma de similaridade genética a partir do coeficiente de Jaccard e agrupado pelo método UPGMA entre 40 genótipos de *Jatropha curcas* L. cultivados em dois municípios de Sergipe, Umbaúba (1 a 20) e Carira (21 a 40).....23
- FIGURA 5.** Análise de Coordenadas Principais (ACoP) a partir do coeficiente de similaridade de Jaccard para 40 genótipos de *Jatropha curcas* L. cultivados em dois municípios de Sergipe, Umbaúba (1 a 20) e Carira (21 a 40).....24

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Seqüências dos *primers* utilizados nas reações de RAPD em pinhão manso.....16

TABELA 2. Relação dos *primers* RAPD com o número de bandas amplificadas nos 40 indivíduos de pinhão manso cultivados em dois municípios de Sergipe, Umbaúba e Carira.....19

TABELA 3. Matriz da similaridade genética do coeficiente de Jaccard (1908) (abaixo da diagonal) e erro estimado (acima da diagonal) obtidos utilizando 17 *primers* pela técnica RAPD entre 40 genótipos de *Jatropha curcas* L. cultivados em dois municípios de Sergipe, Umbaúba (1 a 20) e Carira (21 a 40). (Similaridade média = 0,55; Erro médio = 0,09 e Sgm = 0,67).....21

RESUMO

OLIVEIRA, Vanice Dias de. **VARIABILIDADE GENÉTICA DE PINHÃO MANSO CULTIVADO EM DOIS AGROECOSSISTEMAS DE SERGIPE**. 2010. 33p. (Dissertação – Mestrado em Agroecossistemas). Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, SE*.

RESUMO – *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae) tem atraído bastante interesse nos últimos anos por apresentar elevado potencial de fornecer óleo para produção de biocombustível e isso tem provocado grandes investimentos e expansão rápida das áreas de cultivo em todo mundo. No entanto, é uma cultura que não foi domesticada e carece de provas científicas sobre o seu potencial produtivo e propriedades agrônômicas. Esta situação pode levar a práticas insustentáveis com riscos econômico, social e ambiental. A fim de reduzir estes riscos e melhorar o desempenho da cultura em diferentes condições agroclimáticas é primordial investir na domesticação, seleção e melhoramento genético. Para isso, se faz necessário conhecer o grau de diversidade genética da espécie em populações naturais, plantios isolados, comerciais e experimentais. Diante de tal importância, este trabalho teve como objetivo caracterizar geneticamente genótipos de pinhão manso, cultivados em plantios experimentais, em dois municípios de Sergipe (Umbaúba e Carira), por meio de marcadores moleculares RAPD. Folhas de 20 genótipos de cada área foram submetidas à extração de DNA pelo método CTAB 2%, com modificações. Para amplificação do DNA foram empregados 31 iniciadores de sequência arbitrária. Na avaliação dos géis, a presença (1) e ausência (0) de bandas foram usadas para a construção da matriz binária, que foi utilizada para calcular a porcentagem de polimorfismo obtida com cada *primer* utilizado, além de estimar as similaridades genéticas entre cada par de genótipos empregando o coeficiente de Jaccard e agrupá-los pelos métodos UPGMA e ACoP. Posteriormente também foi calculado o erro de similaridade associado e a similaridade genética média (Sgm). Os 31 *primers* geraram 101 fragmentos, dos quais 30 foram polimórficos. Foi encontrada uma similaridade média entre os genótipos de 0,54 ($\pm 0,09$) e a amplitude das similaridades variou de 0,18 ($\pm 0,07$) a 1,00 ($\pm 0,00$). O valor de Sgm foi igual a 0,67, e, a partir desta foi possível a formação de nove agrupamentos heteróticos, com dois grupos sendo unitários e formados pelos genótipos mais divergentes entre os demais, três e cinco. Pode-se concluir, através dos marcadores RAPD, que a variabilidade genética do pinhão manso é baixa nos cultivos em Carira e Umbaúba.

Palavras-chave: *Jatropha curcas* L.; RAPD; diversidade.

Comitê Orientador: Dra. Ana da Silva Léo – Embrapa Tabuleiros Costeiros/NEREN-UFS (Orientadora); Dra. Ana Veruska Cruz da Silva – Embrapa Tabuleiros Costeiros (Co-Orientadora); Prof. Dr. Pedro Roberto Almeida Viégas – NEREN-UFS; Dr. Leandro Eugenio Cardamone Diniz – Embrapa Tabuleiros Costeiros.

ABSTRACT

OLIVEIRA, Vanice Dias de. **GENETIC VARIABILITY OF PHYSIC NUT (*Jatropha curcas* L.) CULTIVATED IN TWO AGROECOSYSTEM IN SERGIPE.** 2010. 33p. (Dissertation – Master Science in Agroecosystems). Federal University of Sergipe, São Cristóvão, SE. ¹

ABSTRACT: *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae) has attracted considerable interest in recent years because of its high potential to provide oil for the production of biofuel. This interest has resulted in increased investments in the cultivation of *J. curcas* in many areas all over the world. However, *J. curcas* remains an un-domesticated crop and there is a lack of scientific evidence for its productive potential and agronomic properties. This situation could lead to unsustainable practices with economic, social and environmental risks. To reduce these risks and to improve the performance of the *J. curcas* in different agroclimatic conditions, it is very important to invest in the domestication, selection and genetic breeding of *J. curcas*. At this point, it is necessary to know the degree of genetic diversity of the species in natural, isolated cultivated, commercial and experimental populations. Due to the importance in this area, this work had as objective to genetically characterize genotypes of *J. curcas* cultivated in experimental areas in two cities of Sergipe, State of Brazil (Umbaúba and Carira) by means of molecular markers RAPD. The methodology of DNA extraction from leaves of 40 genotypes, collected in the cities of Umbaúba and Carira, was carrying out according to method CTAB 2% and to DNA amplification were used 31 primers of arbitrary sequence. DNA markers were scored for the presence (1) and absence (0) of homologous amplified, which were used in the construction of the binary matrix in order to calculate the percentage of polymorphism of each primer used. This data was also used to estimate the genetic similarity among the pairs of genotypes, using Jaccard coefficient, and group them out for the UPGMA and PCoA methods. Afterwards, the similarity error associated with the minimum value of similarity was calculated. Fragments (101) were generated from 31 primers, 30 of which were polymorphics. A similarity average of 0,54 ($\pm 0,09$) among the genotypes was found and the amplitude similarities varied from 0,18 ($\pm 0,07$) to 1,00 ($\pm 0,00$). The average genetic similarity was equal to 0,67, and from this value it was possible to observe the formation of nine clusters. Two of them were unit clusters and formed by the most divergent genotypes, three and five. In conclusion, it was not possible verify low genetic variability in “physic nut” using RAPD markers at these experimental areas.

Keywords: *Jatropha curcas* L., RAPD, diversity.

Guidance Committe: Dra. Ana da Silva Léo (Major Professor) – Embrapa Tabuleiros Costeiros/NEREN/UFS, Dra. Ana Veruska Cruz da Silva (Co-Major Professor) – Embrapa Tabuleiros Costeiros; Dr. Pedro Roberto Almeida Viégas – NEREN-UFS; Dr. Leandro Eugenio Cardamone Diniz – Embrapa Tabuleiros Costeiros.

1- INTRODUÇÃO

Diversas pesquisas e estudos têm relatado o impacto negativo causado ao planeta e à humanidade pelo uso de combustíveis fósseis, e isso tem provocado um grande interesse mundial por fontes alternativas para produção de energia.

A bioenergia é apontada como única fonte renovável que pode substituir os combustíveis fósseis em todos os mercados de energia (produção de calor, eletricidade e de combustíveis para o transporte), além de reduzir a emissão de gases do efeito estufa. Com o crescente aumento da população e da demanda por energia, estima-se que em 2050 o abastecimento energético advindo de biomassa esteja entre 25 e 33%.

O Brasil, devido a sua elevada extensão territorial e circunstâncias edafoclimáticas apropriadas, tem, atualmente, 388 milhões de hectares de terras aráveis, férteis e com potencial produtivo. A área usada atualmente com matérias-primas para a produção de biodiesel é menor que 20.000 hectares, sendo que, 2.6 milhões de hectares seriam necessários para atender à demanda do B5, mistura de 5% de biodiesel ao diesel do petróleo, que começará a ser compulsória em 2013.

Várias espécies com potencial para atender a essa necessidade, juntamente com suas aptidões regionais, têm sido listadas e, entre essas culturas, tem se destacado soja, dendê, girassol, amendoim, canola, mamona e pinhão manso.

Na região Nordeste do Brasil, o óleo da mamona já vem sendo usado para produzir biodiesel e, o pinhão manso (*Jatropha curcas* L.), vem recebendo atenção para ser cultivado nesta região com esta finalidade, pois é uma espécie bastante adaptável às suas condições agroclimáticas, podendo ser cultivada em consórcio com culturas alimentares, e por ser perene, apresenta baixo custo para sua manutenção.

No Brasil, essa espécie não foi domesticada, o potencial produtivo em plantios com idade superior a quatro anos não é conhecido e não há cultivares melhoradas para serem recomendadas e cultivadas com segurança. Apesar disso, sabe-se que o plantio de pinhão manso vem sendo amplamente incentivado e em várias partes do país já se pode encontrar diversas áreas de cultivo. Nessas áreas, os genótipos que estão sendo utilizados são de constituição genética desconhecida e os produtores não têm garantias quanto à adaptação ao ambiente com produtividade desejada.

Vários países interessados na cultura do pinhão manso, principalmente Índia e China, têm coletado acessos de seus territórios e de outras partes do mundo, visando à caracterização da diversidade para conservação e melhoramento genético. No Brasil, as pesquisas foram iniciadas e estão sendo conduzidas pela EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária), EPAMIG, EBDA (Empresa Baiana de Desenvolvimento Agrícola), UFS (Universidade Federal de Sergipe) e outras instituições.

O melhoramento genético do pinhão manso busca selecionar materiais e gerar cultivares com elevada produtividade de grãos e teor de óleo, sem toxidez (curcina e ésteres de forbol), resistentes a pragas e doenças e adaptadas às condições agroclimáticas das diferentes regiões produtoras do país.

Antes de iniciar um programa de melhoramento, é necessária a coleta de material genético, a caracterização e a avaliação desses materiais. Essa caracterização pode ser realizada empregando-se marcadores ou descritores agronômicos, morfológicos e moleculares. Os moleculares, baseados no DNA do indivíduo, são mais precisos, pois não sofrem influência ambiental.

Diferentes tipos de marcadores moleculares encontram-se disponíveis para a detecção da variabilidade genética a nível de DNA, como por exemplo, RAPD, AFLP, ISSR, SSR, RFLP, entre outros, visando a detecção de polimorfismo genético. Dentre esses marcadores, o RAPD (Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso) é a técnica mais acessível, por ter menor custo, e já vem sendo usada com sucesso para estudos de diversidade genética em várias espécies.

A presente pesquisa teve como objetivo avaliar a variabilidade genética de genótipos de pinhão manso cultivados em áreas experimentais da Embrapa Tabuleiros Costeiros em dois municípios do Estado de Sergipe (Umbaúba e Carira), utilizando marcadores moleculares RAPD.

2- REVISÃO DA LITERATURA

2.1- Desenvolvimento sustentável e os biocombustíveis

Desenvolvimento sustentável, de acordo com a Comissão Mundial para o Meio Ambiente e Desenvolvimento, é um *"processo dinâmico destinado a satisfazer as necessidades atuais sem comprometer a capacidade das gerações futuras de atenderem suas próprias necessidades"* (ALTIERI; MASERA, 1997).

A garantia de suprimento dessas necessidades tem sido ameaçada, pois está fundamentada na produção e consumo de energia oriunda de combustíveis fósseis, que além de gerar poluição local e emitir gases de efeito estufa, são um recurso limitado e não renovável (GOLDEMBERG; LUCON, 2007) e isso tem provocado a busca por uma matriz energética com fontes alternativas e renováveis.

A bioenergia, desde então, tem sido apontada como única fonte renovável que pode substituir os combustíveis fósseis em todos os mercados de energia (produção de calor, eletricidade e de combustíveis para o transporte). A Agência Internacional de Energia (IEA) afirma que todos os países apresentam potencial para uso da bioenergia de forma sustentável e que podem utilizá-la para reduzir custos, emissão de gases do efeito estufa e estima para o ano 2050, com base no aumento da população e do consumo de energia, que o abastecimento energético advindo da biomassa esteja entre 25 e 33% (IEA BIOENERGY, 2009).

A matriz energética brasileira está composta, em parte, por fontes de energias renováveis, que foram responsáveis por cerca de 50% de toda a energia produzida no país em 2008 (EPE, 2009) e há expectativa de crescimento da contribuição da biomassa na composição dessa matriz.

Para que este crescimento ocorra de forma sustentável, os empreendimentos envolvidos na geração de energia pela biomassa precisam incorporar e promover a agricultura familiar ao longo das cadeias de produção, além de serem socialmente justos e viáveis econômica e ambientalmente (MORET et al., 2006).

Dentro desta perspectiva, o Governo brasileiro lançou em 2004 o PNPB (Programa Nacional de Uso do Biodiesel), regulamentado pela lei n. 11.097/2005, estabelecendo que a partir de janeiro de 2008 fosse obrigatória em todo o território nacional a mistura B2 (2% de

biodiesel e 98% de diesel de petróleo), e em janeiro de 2013, essa obrigatoriedade passará para 5% (mistura B5).

Um conjunto de medidas específicas também foi tomado objetivando incluir e fortalecer a agricultura familiar na cadeia de produção do biodiesel e reduzir disparidades regionais mediante a geração de emprego e renda. Uma delas foi a concessão do Selo Combustível Social, que garante benefícios tributários e fiscais aos produtores de biodiesel que adquirirem matéria-prima de unidades de produção familiar (ACCARINI, 2006).

Diante deste cenário, o cultivo de espécies oleaginosas com fins energéticos tende a aumentar e, o Brasil, possui grande potencial para liderar o mercado de biocombustíveis, pois tem elevada extensão territorial, apresenta circunstâncias edafoclimáticas apropriadas, e tem 388 milhões de hectares de terras aráveis, férteis e com potencial produtivo e desses, 90 milhões não foram explorados ainda. A área utilizada atualmente com matérias-primas para a produção de biodiesel é menor que 20.000 hectares, sendo que 2,6 milhões de hectares seriam necessários para atender a demanda do B5 (JBIC; MAPA, 2006).

Várias espécies potenciais têm sido relacionadas para serem cultivadas no Brasil de acordo com as aptidões agroclimáticas de cada região: dendê, babaçu, soja, girassol, canola, mamona e pinhão manso (SLUSZZ; MACHADO, 2006).

A mamona e o pinhão manso são mais aptas para serem cultivadas na região Nordeste, pois ambas possuem rusticidade e resistência à seca (SLUSZZ; MACHADO, 2006). Outra vantagem dessas duas espécies para o cultivo sustentável, é que ambas não competem com a agricultura de alimentos e ainda podem ser consorciadas com outras culturas bioenergéticas e culturas alimentares de subsistência (MORET et al., 2006).

O pinhão manso, por ser perene, apresenta vantagens em relação às culturas anuais para garantir a sustentabilidade da biomassa para produção de energia (FRITSCHÉ et al., 2009; IEA BIOENERGY, 2009). Segundo esses mesmos autores, os múltiplos sistemas agrossilviculturais que podem ser empregados com as culturas perenes conferem aumento do rendimento de energia, por causa da diminuição da entrada de agroquímicos e ganhos em biodiversidade.

Dessa forma o pinhão manso pode ser uma excelente alternativa para a produção do biodiesel, pois possui alto potencial de produtividade de óleo, baixo custo de produção por ser perene, além de ser resistente ao estresse hídrico, o que é uma vantagem significativa principalmente na região semi-árida do país (ARRUDA et al., 2004).

2.2. Aspectos gerais do pinhão manso

O pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) é uma espécie nativa da América tropical, mas atualmente é encontrada em muitas regiões tropicais e intertropicais da África, da Ásia e da Austrália (JONGSCHAAP et al., 2007), devido à distribuição por portugueses pelas ilhas de Cabo Verde e Guiné Bissau (HELLER, 1996).

Pertence à família Euphorbiaceae, que contém cerca de 8000 espécies e 320 gêneros. No gênero *Jatropha* são agrupadas cerca de 170 espécies de plantas herbáceas e arbustivas que apresentam as mais variadas propriedades e usos. É denominada também como: *physic nut* e *purgin nut*, em inglês; pinhão-manso, pinhão-de-cerca, pinhão-de-purga, purgueira, pinhão-paraguaio e grão-de-maluco em português; *pinõncillo* e *tempate*, em espanhol; e *pignon d'Inde* e *purghere*, em Francês (HELLER, 1996).

O pinhão manso é um arbusto grande, de crescimento rápido, cuja altura normal é dois a cinco metros (HELLER, 1996), mas pode alcançar até 20 metros em condições especiais, e para facilitar a colheita o ideal é que tenha de 2,5 a 5m de altura (CARVALHO et al., 2009).

O diâmetro do tronco é de, aproximadamente, 20 cm, apresentando crescimento articulado, e, geralmente, suas raízes são em número de cinco, com uma central e quatro periféricas (CARELS, 2009). A planta possui caule liso, macio, de cor esverdeada a cinzento-castanha e o tronco se divide na base em vários ramos. Estes possuem cicatrizes por causa da queda das folhas na estação seca, que ressurgem logo após as primeiras chuvas (SATURNINO et al., 2005).

As folhas do pinhão são decíduas, alternadas a sub-opostas, de filotaxia espiral, cordatas na base, com três a cinco lóbulos, pecioladas, com nervuras esbranquiçadas e salientes na face inferior. Quando jovens a coloração é vermelho-vinho e são verdes, pálidas, glabras e brilhantes ao se expandirem (NUNES, 2007).

A inflorescência é uma cimeira definida, a qual surge junto com as folhas novas. É uma planta monóica, com flores unissexuais e produzidas na mesma inflorescência. Apresenta flores masculinas em maior número nas extremidades das ramificações e femininas nas ramificações, as quais são amarelo-esverdeadas e diferencia-se pela ausência de pedúnculo articulado, que nas femininas são largamente pedunculadas. Ocasionalmente, ocorrem flores hermafroditas e, raramente, autopolinização (HELLER, 1996). É uma planta alógama, com 95% de polinização cruzada, que ocorre principalmente pela ação de insetos (CARVALHO et al., 2009).

O fruto é capsular-ovóide, trilocular com uma semente em cada lóculo, formado por um pericarpo ou casca dura e lenhosa, deiscente, inicialmente verde, passando a amarelo, castanho e por fim preto quando atinge o estágio de maturação. Os frutos têm em média de 2,5 a 4 cm de comprimento, com diâmetro variando de 2,0 a 3,0 cm. Contém de 53 a 62% de sementes e de 38 a 47% de casca (ARRUDA et al., 2004; NUNES et al., 2009).

As sementes, quando secas, têm, aproximadamente, 1,5 a 2 cm de comprimento e 1,0 a 1,5 cm de largura, são ovaladas, endospermicas, possuindo tegumento rijo, quebradiço, de fratura resinosa. Debaixo do invólucro da semente existe uma película branca cobrindo a amêndoa; albúmen abundante, branco, oleaginoso, contendo o embrião de formato reto e providos de dois cotilédones planos, foliáceos e arredondados (NUNES et al., 2009).

O pinhão-manso é utilizado desde tempos antigos em aplicações medicinais, iluminação de casas e vilarejos, para a produção de sabão e como cerca-viva (HELLER, 1996), e sua tolerância à seca com a presença de raízes laterais perto da superfície tem tornado a planta atraente para programas de combate a erosão, desertificação e reflorestamento na Índia, China e Cabo Verde (WIESENHÜTTER, 2003; SATURNINO et al., 2005).

Na medicina popular, o látex da planta tem propriedade antimicrobiana e cicatrizante, as raízes são usadas como diuréticas e antileucêmicas, e as folhas combatem doenças na pele. O óleo é aplicado no tratamento de eczema, doenças de pele e reumatismo e usado para fabricação de sabão devido ao seu alto teor de glicerina. A ingestão das sementes pode provocar vômitos e diarreia devido à presença de curcina e ésteres de forbol, de alta toxicidade (HELLER, 1996).

Atualmente o foco maior tem sido dado ao óleo para produção de biodiesel, pois suas sementes contêm entre 25 a 39% (KAUSHIK et al., 2007), e esse óleo é incolor, inodoro, muito fluído e fácil de extrair por pressão (ARRUDA et al., 2004), não é comestível nas variedades tóxicas e apresenta todas as qualidades para ser transformado em biodiesel por transesterificação (SINGH et al., 2008). Possui boa estabilidade de oxidação, comparado ao óleo de soja, baixa viscosidade, se comparado com o óleo da mamona, e baixo ponto de congelamento, se comparado com o óleo de palma (CARELS, 2009).

Como subproduto da extração do óleo, o pinhão manso fornece a torta, que é inadequada para alimentação animal, mas pode ser usada como adubo orgânico, pois apresenta elevados teores de nitrogênio, fósforo e potássio (MENDONÇA; LAVIOLA, 2009).

2.3. Aspectos agronômicos e produção de pinhão manso

O pinhão manso apresenta ampla faixa de distribuição geográfica pelo mundo, que ocorreu principalmente por ser uma planta rústica, resistente a longos períodos seca e de ser adaptável a qualquer tipo de solo, desde os mais pobres até os mais férteis, em terrenos áridos e pedregosos (HELLER, 1996).

Segundo Arruda et al. (2004), a produtividade do pinhão manso pode variar bastante em função da região de plantio, método de cultivo e tratos culturais, idade da cultura, bem como da quantidade de chuva e da fertilidade do solo, e para tanto, Carvalho et al. (2009) recomenda o cultivo em solos corrigidos, profundos, férteis, planos e bem drenados.

Cresce entre temperatura variando de 15 a 40 °C, pluviosidade entre 250 e 3000 mm (FOIDL et al., 1996), mas a melhor faixa de temperatura para bom desenvolvimento fica entre 20 e 28°C, quando a pluviosidade é maior que 1000 mm, produz durante todo ano e é mais recomendado o seu cultivo em altitudes entre 500 e 800m (HELLER, 1996; CARVALHO et al., 2009).

O plantio de pinhão manso pode ser feito por estaquia ou por sementes. De acordo com estudos de Smiderle e Kroetz (2008) e Carvalho et al. (2009), as estacas devem ser extraídas de ramos mais próximos da base (lenhosos), de matrizes de boa origem, saudáveis, com bom desenvolvimento, de até dois anos de idade e com 40 a 50 cm de comprimento. Mas a desvantagem deste método se dá por a planta não formar raiz pivotante, ficando mais vulnerável ao estresse hídrico, por limitar a exploração do solo em maior profundidade, ter menor longevidade, ser mais suscetível ao tombamento e ao ataque de pragas e doenças (SATURNINO et al., 2005).

A propagação por sementes pode ser realizada pelo plantio direto ou por mudas transplantadas. Devem-se criar mecanismos que favoreçam a germinação, a emergência de plântulas, o crescimento e o desenvolvimento, como por exemplo, a correção do solo e a quebra de camadas de impedimento para rápido crescimento das raízes e estabelecimento das plantas (CARVALHO et al., 2009).

As plantas propagadas por via seminal apresentam maior robustez e têm maior longevidade que as plantas oriundas de estacas, porém, os plantios são desuniformes, a maturação e a produção dos frutos são mais irregulares, pois as sementes, dentro do mesmo cacho, têm idades diferentes, conforme o dia de abertura das flores femininas, e dentro da mesma planta, conforme época de florescimento, o que dificulta a colheita (SATURNINO et

al., 2005; BELTRÃO et al., 2006).

O pinhão manso não foi domesticado e não há estatísticas confiáveis sobre área plantada, produtividade e rentabilidade da cultura em plantio solteiro ou em consórcio (BELTRÃO et al., 2006). No entanto, em mais de 50 países, seu plantio vem sendo amplamente incentivado para produção de biodiesel (BASHA; SUJATHA, 2009).

No Brasil, esta espécie está disseminada em grande parte do país, em cultivos isolados, em alamedas e cercas, quintais e sítios. Desde a década de 80 e, de forma mais intensiva, a partir de 2005, vem sendo plantada em áreas comerciais e experimentais, visando o entendimento de sua biologia e aproveitamento para a produção de óleos (DURÃES; LAVIOLA, 2010).

Acredita-se que haja no Brasil mais de 30 mil hectares de área plantada com pinhão manso (MENDONÇA; LAVIOLA, 2009) e para validar estes dados, além de coletar dados sobre produção, produtividade, rentabilidade e informações sobre indústrias que fazem a extração do óleo do pinhão manso no Brasil, a CONAB fará o levantamento nos Estados de MT, MG, GO, TO, MA, ES, SP, BA, PA, RJ e do DF (CONAB, 2010).

Em Sergipe, a Embrapa Tabuleiros Costeiros conduz ensaios experimentais, desde o ano de 2006, nos municípios de Carira, Frei Paulo, Nossa Senhora das Dores e Umbaúba, e na Bahia, no município de Paripiranga (informação verbal) ².

2.4. Recursos genéticos de pinhão manso: conservação, caracterização e melhoramento

Agrobiodiversidade pode ser definida como os recursos genéticos utilizados na agricultura, cujos constituintes entram nos sistemas de produção e exercem um papel fundamental no estabelecimento de cadeias produtivas agrícolas (VILELA-MORALES; VALOIS, 2000). A sustentabilidade dos agroecossistemas depende da possibilidade de abastecimento constante desses recursos para seu funcionamento (MARTINS, 2001), cuja fonte está na variabilidade genética encontrada nos centros de origem e bancos de germoplasma das espécies (BORÉM; MIRANDA, 2005).

Na agricultura atual, um dos mais graves problemas que existe é a perda dessa diversidade genética, tornando os agroecossistemas mais vulneráveis às adversidades ambientais e aos desastres naturais (MARTINS, 2001). Uma das maneiras de contorná-la

² Informação fornecida por Hélio W. L. de Carvalho e Ivênio R. de Oliveira, na Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju-SE, em setembro de 2009.

encontra-se na conservação, que “*compreende a preservação, manutenção, utilização sustentável, restauração e melhoria do ambiente natural*” (INSTITUTO DE RECURSOS MUNDIAIS, 1992 *apud* NASS, 2001).

Existem duas formas de conservação da biodiversidade: *in situ* e *ex situ*. Na primeira, o germoplasma é mantido dentro do ecossistema natural, enquanto na *ex situ* a manutenção é realizada em condições artificiais (BORÉM; MIRANDA, 2005).

Três instituições, na Costa Rica, Burkina Faso, e outra no Cabo Verde têm coletado e armazenado germoplasma de pinhão manso de diferentes procedências, através da conservação *in situ* e bancos de sementes (HELLER, 1996). Na Índia, há conservação do germoplasma *in situ* dessa espécie em quatro regiões ecogeográficas (SUNIL et al., 2008), e outras instituições, neste mesmo país, na China, Tailândia, Filipinas, México, Guatemala, Holanda e Brasil têm constituído bancos de germoplasma do gênero *Jatropha* para caracterização e programas de melhoramento (CARELS, 2009).

No Brasil, as principais instituições responsáveis pela composição desses bancos de germoplasma são a EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária), EPAMIG (Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais), EBDA (Empresa Baiana de Desenvolvimento Agrícola) e UFS (Universidade Federal de Sergipe) (CARELS, 2009).

O banco de germoplasma da Embrapa Agroenergia/Embrapa Cerrados conta com cerca de 200 acessos oriundos de diversas regiões do Brasil, que servirão de estudo para implantação de um programa de melhoramento que busca selecionar cultivares com alta produtividade de grãos e teor de óleo, sem constituintes tóxicos (curcina e ésteres de forbol), resistentes a estresses bióticos e abióticos e adaptadas às principais regiões produtoras do país (LAVIOLA, 2010). Este autor estima que sejam necessários de cinco a sete anos para se obter cultivares melhoradas e informações seguras para sistemas de cultivo e produção comercial de pinhão manso para diferentes regiões do Brasil.

Para que programas de melhoramento genético obtenham sucesso é necessária a disponibilidade de suficiente variabilidade genética para as características desejadas. Alguns passos são primordiais para isso: coleta, introdução, caracterização, avaliação e conservação de germoplasma (BORÉM; MIRANDA, 2005)

A caracterização de germoplasma consiste em levantar dados que descrevam, identifiquem e permitam diferenciar os indivíduos, genótipos ou acessos das espécies

(VICENTE et al., 2005). Esta caracterização pode ser realizada empregando-se descritores botânicos, morfológicos, agronômicos e moleculares (MILACH, 1998).

Estes últimos, também conhecidos como marcadores moleculares, são definidos como “*características de DNA que diferenciam dois ou mais indivíduos e são herdadas geneticamente*” (MILACH, 1998). Esses marcadores são distribuídos de forma aleatória no genoma e não são influenciados pelo estágio de desenvolvimento da planta e nem pelas variações ambientais (OLIVEIRA et al., 2007).

Vários tipos de marcadores moleculares foram desenvolvidos e podem ser separados em dois grupos: hibridização ou amplificação (MILACH, 1998). No grupo de hibridização estão os marcadores RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) e Minissatélites ou locos VNTR (*Variable Number of Tandem Repeats*). Os revelados pela amplificação do DNA são o RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), SCAR (*Sequence Characterized Amplified Regions*), Microssatélite ou SSR (*Simple Sequence Repeats*), ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), entre outros (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Dentre essas técnicas, o RAPD é a mais acessível, pois é mais fácil de implementar, tem menor custo, número de etapas e a obtenção de resultados é mais rápida (OLIVEIRA et al., 2007). Ela se baseia na amplificação de fragmentos de DNA por PCR (*Polymerase Chain Reaction*), com posterior separação dos fragmentos por eletroforese em meio semi-sólido e visualização, com o auxílio da coloração em brometo de etídio e exposição a luz ultravioleta (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Em cada reação de RAPD, utiliza-se apenas um tipo de iniciador ou *primer*, sendo este de composição arbitrária, com 10 nucleotídeos e diferentes combinações das quatro bases nitrogenadas (LACERDA et al., 2002). Na teoria, é possível sintetizar 5.040 *primers*, mas algumas combinações não podem ser utilizadas, pois é necessário que o *primer* tenha mais de 50% de G+C na composição para que a ligação com o DNA molde seja mais estável, porque G e C são ligadas por três pontes de hidrogênio (SCHUSTER; CRUZ, 2008).

A principal utilização da técnica de RAPD tem sido a determinação da diversidade e da estrutura genética em populações naturais (LACERDA et al., 2002) e, o nível de polimorfismo obtido com estes estudos, pode variar conforme a espécie estudada (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Esta técnica foi utilizada com sucesso na caracterização de variedades e na distinção de clones de espécies da mesma família do pinhão manso, como a mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) (COSTA et al., 2003), a mamona (*Ricinus communis* L.) (CERQUEIRA, 2008) e a seringueira (*Hevea brasiliensis* M.) (BICALHO et al., 2008).

Marcadores RAPD permitem identificar também, segmentos do genoma herdados após diferentes métodos de hibridação em progênes híbridas. Com o uso de RAPD, Ram et al. (2008), estabeleceram relações filogenéticas e encontraram marcas específicas capazes de discriminar as espécies *J. curcas*, *J. ramanadensis*, *J. podagrica*, *J. gossypifolia*, *J. tanjorensis*, *J. villosa*, *J. glandulifera*, *J. integerrima*.

Similarmente, Pamidimarri et al. (2009a) utilizaram RAPD, combinado com a técnica de AFLP, para estabelecer a filogenia entre sete espécies de *Jatropha* e encontrar marcas específicas a serem utilizadas na identificação de híbridos interespecíficos, melhoramento e gerenciamento dos recursos genéticos destas espécies.

Híbridos interespecíficos de *J. curcas* e *J. integerrima* foram desenvolvidos com objetivo de combinar características agronômicas desejáveis e a técnica de RAPD também foi usada para distinguir a herança de fragmentos nas progênes híbridas (DHILLON et al., 2009). Em outro trabalho semelhante, Basha e Sujatha (2009), aplicaram quatro tipos de marcadores moleculares, entre eles, RAPD e ISSR, para confirmar a hibridização entre *J. curcas* e outras espécies do mesmo gênero.

Essas mesmas técnicas foram empregadas para avaliar a diversidade genética e distinguir 42 acessos de *J. curcas* da Índia e um acesso, não-tóxico, do México, como também para desenvolver marcadores SCAR específicos para diferentes populações (BASHA; SUJATHA, 2007). As metodologias de RAPD, AFLP e SSR, também foram capazes de distinguir dois acessos mexicanos de *Jatropha* (um tóxico e outro não tóxico) (Pamidimarri et al., 2009b).

Outros estudos, também realizados com marcadores moleculares, têm objetivado mensurar o grau de similaridade genética de pinhão manso em diferentes populações. Ranade et al. (2008), por exemplo, avaliaram através de RAPD e DAMD (*directed amplification of minisatellite-region DNA*), genótipos de *J. curcas* de seis diferentes localidades, e encontraram vários indivíduos com similaridade igual a 100%, oriundos de uma mesma procedência. Diferentemente, Gupta et al. (2008), ao analisarem a divergência genética de pinhão manso de quatro procedências, com 20 *primers* RAPD e 25 *primers* ISSR,

encontraram maior variação entre os genótipos dentro (65%) das populações do que entre (35%) as populações.

No trabalho conduzido por Ikbali et al. (2010), 50 iniciadores RAPD foram empregados, 44 foram reprodutíveis e selecionados para acessar a diversidade genética de 40 genótipos de *J. curcas* de cinco populações. Já no estudo feito por Subramanyan et al. (2009), em 40 genótipos de pinhão manso de 20 regiões, dos 43 *primers* decâmeros empregados, apenas 10 foram considerados. Os resultados, em ambos os trabalhos, revelaram alto grau de polimorfismo genético entre os acessos estudados.

O pinhão manso está sendo cultivado em mais de 50 países (BASHA; SUJATHA, 2009), e, apesar disso, na maioria dos trabalhos, como os acima citados, envolvendo caracterização molecular, quase 100% dos acessos de *Jatropha* e *J. curcas* pertencem ao germoplasma indiano. Na literatura, atualmente disponível, há poucos trabalhos envolvendo a avaliação da diversidade, por meio de análise molecular, do germoplasma dessa espécie em outros países, que não seja a Índia.

Na China, pode-se citar a caracterização de 54 acessos coletados nesse país e dois da Malásia, por meio de marcadores AFLP e SSR (SUN et al., 2008). Basha et al. (2009), além da Índia e China, incluíram acessos coletados no Cabo Verde, Egito, Madagascar, África, Uganda, Filipinas, Tailândia, Vietnã, México e El Salvador. Nove acessos da América do Sul foram também analisados por Wen et al. (2010) através de 36 EST-SSRs e 20 G-SSRs.

No Brasil, Rosado et al. (2009) caracterizaram, com RAPD e SSR, 192 acessos de pinhão manso de mais de 40 regiões do país. Em Sergipe, nas áreas onde existem cultivos experimentais de pinhão manso, com exceção da origem das sementes que compuseram esses plantios, não existem informações sobre a diversidade genética desses materiais.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 – Área de estudo e coleta de material vegetal

Os indivíduos de pinhão manso selecionados neste estudo foram cultivados experimentalmente, em dois municípios de Sergipe, Umbaúba e Carira (Figura 1).

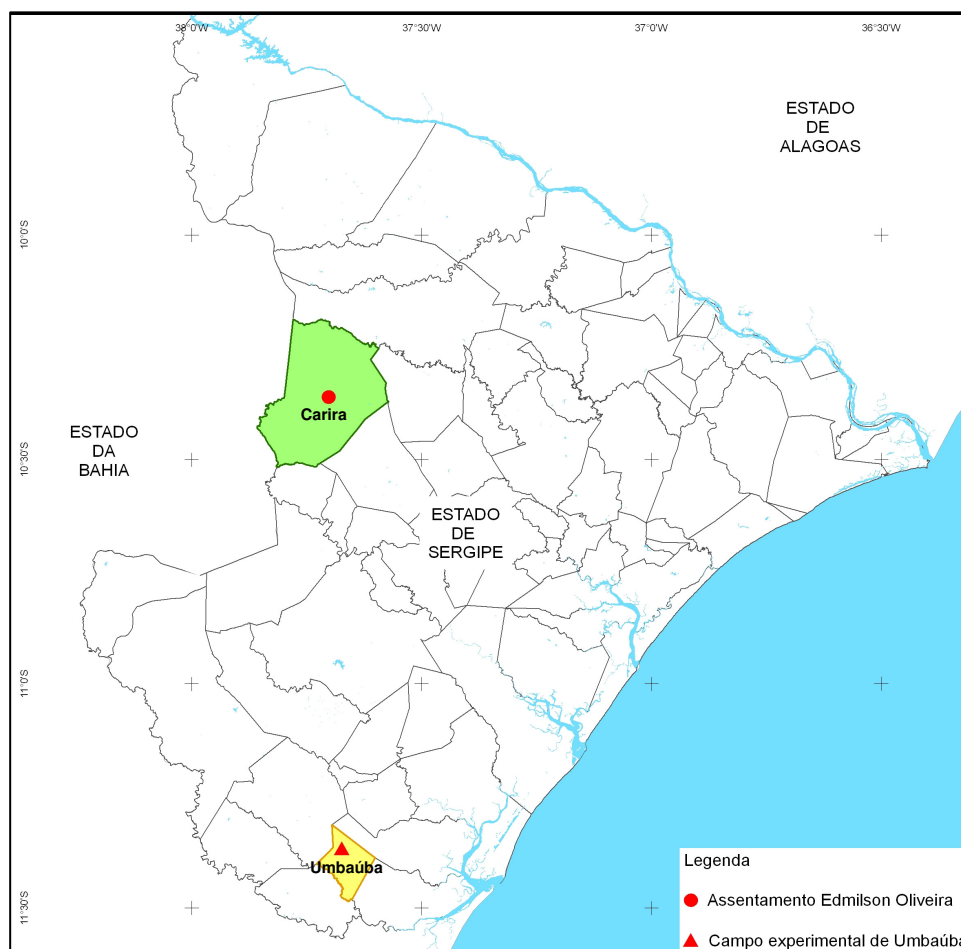


FIGURA 1. Mapa de Estado de Sergipe com a localização dos municípios de Carira e Umbaúba. Elaboração e diagramação: Alessandra Moraes – Laboratório de Geotecnologias Aplicadas, Embrapa Tabuleiros Costeiros.

Em Umbaúba, foi implantado no Campo Experimental de Umbaúba (CEU), da Embrapa Tabuleiros Costeiros, em plantio solteiro, cujas coordenadas geográficas locais são 11°22'37''S, 37°40'26''W, e altitude média de 109 m (Figura 2A). Em Carira, foi implantado no Assentamento Edmilson Oliveira, em plantio consorciado com feijão comum (*Phaseolus*

vulgaris) (Figura 2B), com milho (*Zea mays*) (Figura 2C) e girassol (*Helianthus annuus*) (Figura 2D), cujas coordenadas locais são 10°21'42"S, 37°42'01"W e altitude média de 351 m.

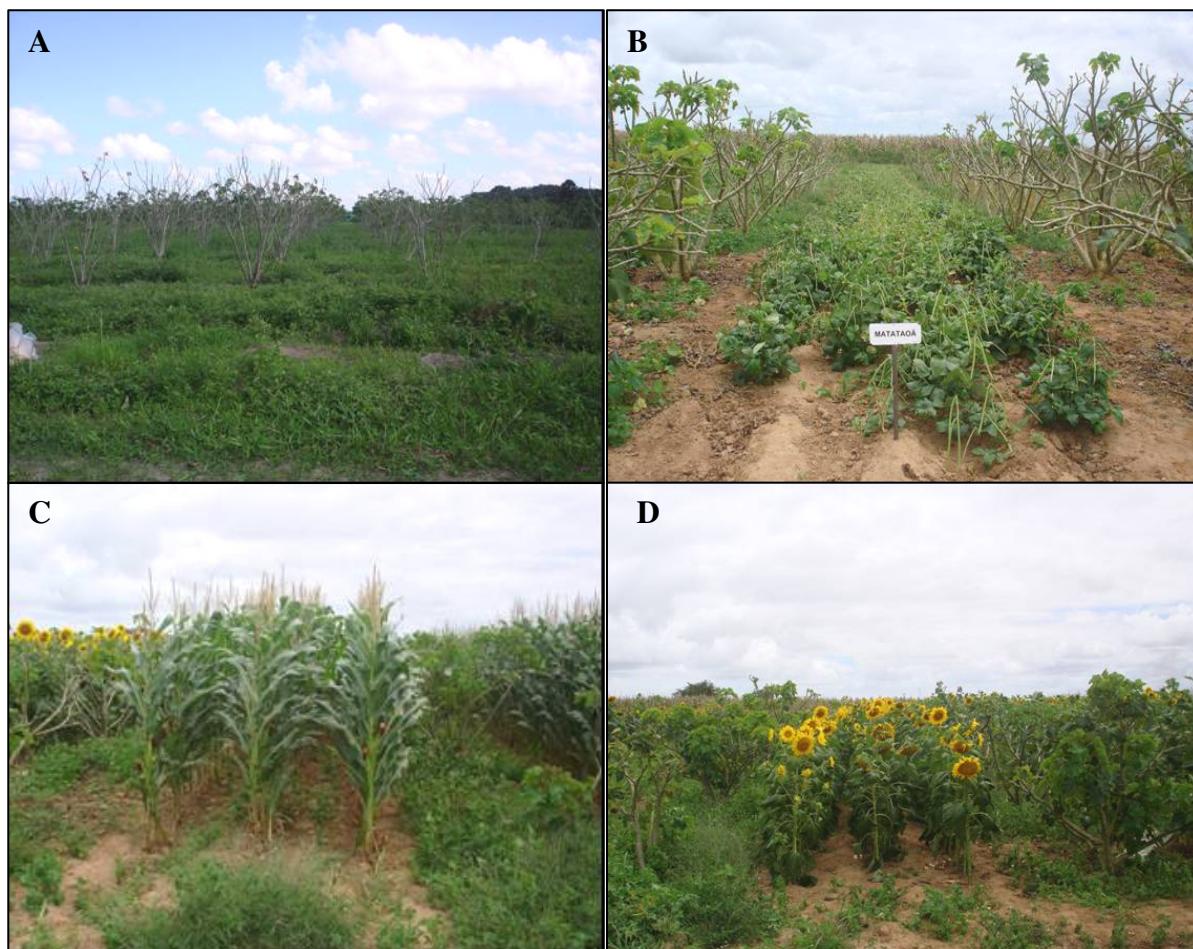


FIGURA 2. A - Cultivo de pinhão manso, solteiro, no Campo Experimental de Umbaúba-SE, da Embrapa Tabuleiros Costeiros; B - consorciado com feijão comum; C- com milho e D - com girassol, no Assentamento Edmilson Oliveira, Carira-SE. Fotos: Vanice Dias.

Para a caracterização molecular, foram selecionados ao acaso, de cada uma dessas áreas, 20 indivíduos de pinhão manso, que tiveram amostras de folhas jovens coletadas, identificadas, acondicionadas em sacos plásticos e mantidas em gelo até a chegada ao Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

No laboratório, as folhas foram lavadas, secas, acondicionadas em envelopes de papel identificados e mantidas a -20°C até o momento da extração.

3.2 - Extração de DNA

Para extração de DNA, cerca de 300 mg de folhas jovens foram maceradas em nitrogênio líquido com auxílio de almofariz e pistilo, adicionando-se, em seguida, 800 µL de tampão de extração, de acordo com método CTAB (2% de CTAB, EDTA – 0.5 M pH 8.0, Tris-Cl – 1 M pH 8.0, NaCl 5M, 2% de PVP-40) proposto por Doyle & Doyle (1990), com modificações.

As amostras foram transferidas para microtubos e incubadas em banho-maria a 65°C por cerca 30 minutos, invertendo os microtubos a cada 10 minutos. Após esta fase, foram adicionados 800 µL de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) em cada amostra, em seguida foram homogeneizadas por dois minutos. As amostras foram centrifugadas a 4°C por 10 minutos e a 13.500 rpm. Posteriormente, o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo. Para precipitação do DNA, adicionou-se 500 µL de isopropanol gelado ao sobrenadante, incubando-se por uma hora a -20°C. Para lavagem do *pellet*, os tubos foram, então, submetidos a uma nova centrifugação a 4°C, por cinco minutos a 13.000 rpm e o sobrenadante, desta vez, foi descartado. Adicionou-se ao *pellet* 450 µL de etanol 70%, centrifugando por cinco minutos a 13.000 rpm, descartando novamente o sobrenadante (etanol), seguida de nova purificação com etanol 70%. O *pellet* foi seco na temperatura ambiente e ressuscitado com 60 µL de TE (100mM Tris / 10mM EDTA).

Foi realizada uma nova purificação, adicionando às amostras 140 µL de TE e 300 µL de etanol absoluto, homogeneizando-as e incubando-as a -80°C por uma hora. Procedeu-se uma nova centrifugação a 4°C e 13.000 rpm por 20 minutos, descartando o sobrenadante. O *pellet* foi lavado por 2x em etanol 70% (300 µL) com centrifugação a 4°C e 13.000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado, o *pellet* seco em temperatura ambiente e ressuscitado com 60 µL de TE.

3.3 - Amplificação do DNA genômico (RAPD)

As reações de RAPD foram realizadas com base no método descrito por Willians et al. (1990), usando para amplificação, 31 *primers* de dez bases com seqüência arbitrária (Tabela 1).

TABELA 1. Sequências dos *primers* utilizados nas reações de RAPD em pinhão manso.

Primer	Sequência 5' – 3'	G + C (%)
A 02	TGC CGA GCT G	70
A 04	AAT CGG GCT G	60
A 10	GTG ATC GCA G	60
A 11	CAA TCG CCG T	60
A 12	TCG GCG ATA G	60
A 13	CAG CAC CCA C	70
A 15	TTC CGA ACC C	60
A 16	AGC CAG CGA A	60
A 17	GAC CGC TTG T	60
A 18	AGG TGA CCG T	60
A 19	CAA ACG TCG G	60
A 20	GTT GCG ATC C	60
B 03	CAT CCC CCT G	70
B 11	GTA GAC CCG T	60
B 18	CCA CAG CAG T	60
K 20	GTG TCG CGA G	70
S 01	CTA CTG GCG T	60
S 18	CTG GCG AAC T	70
X 01	CTG GGC ACG A	70
W 02	ACC CCG CCA A	70
W 03	GTC CGG AGT G	70
W 04	CAG AAG CGG A	60
W 08	GAC TGC CTC T	70
W 13	CAC AGC GAC A	60
W 19	CAA AGC GCT C	60
IDT 01	CAG GCC CTT C	70
IDT 03	GTT TCG CTC C	60
IDT 05	TTC GAG CCA G	60
IDT 06	GTG AGG CGT C	70
IDT 09	CCC AAG GTC C	70
IDT 18	GGA GGA GAG G	70

As reações de amplificação foram conduzidas em termociclador Biocycler®, para 96 amostras, em um volume total de 25µL, contendo 14,8 µL de água ultra-pura; 5,0 µL de tampão PCR 10X (Promega®, USA); 0,5µL de Mix de dNTPs (2,5 mM cada), 0,2µL da enzima Taq DNA polimerase (5 U) (Easy Path®); 2,5µL do primer (5 mM) e 2µL do DNA genômico. Foi utilizada, para cada *primer*, uma reação controle, onde foi adicionado água ultra-pura no lugar do DNA.

As reações foram submetidas a 35 ciclos de amplificação após a desnaturação inicial a 96°C por 5 minutos. Cada ciclo constituiu-se de 45 segundos para desnaturação a 95°C, 45 segundos para anelamento a 36°C e 45 segundos para a extensão a 72°C. Ao final dos 35 ciclos foi realizada uma extensão final de 10 minutos a 72°C.

Os produtos da amplificação foram separados por eletroforese em cuba horizontal, utilizando-se gel de agarose 1% em tampão TBE 1X (Tris-Boro-EDTA), a 120 V por cerca 2

horas. Em seguida, o gel foi corado com brometo de etídio (0,4 µg/mL) e os produtos da amplificação visualizados e fotografados sob luz ultravioleta, em transiluminador Loccus Biotecnologia®, modelo L-PIX-HE.

3.4 - Análise de dados moleculares e obtenção da similaridade genética

Na avaliação dos géis, a presença (1) e ausência (0) de bandas foi usada para a construção de uma matriz binária. As estimativas das similaridades genéticas (S_{gij}) entre cada par de indivíduos foram efetuadas empregando os coeficientes de Jaccard por meio da expressão: $S_{gij} = a/a+b+c$. As variáveis das expressões foram obtidas conforme o esquema abaixo:

Presença (1) e/ou ausência (0) de bandas em cada par (ij)

	Genótipo i	
	1	0
Genótipo j	1	a (1, 1) b (1, 0)
	0	c (0, 1) d (0, 0)

Onde:

- a: presença de bandas em ambos os genótipos;
- b: presença de banda no primeiro genótipo e ausência no segundo;
- c: presença no segundo e ausência no primeiro; e
- d: a ausência em ambos os genótipos.

Os erros associados à similaridade foram estimados segundo Skroch et al. (1992) pelas seguintes expressões:

Variância da similaridade genética (V):

$$V = ns \frac{(1-s)}{(n-1)}$$

Onde: s = similaridade genética entre cada par de genótipos e n = número total de bandas utilizadas na estimativa das similaridades.

Erro padrão estimado (E):

$$E = \left(\frac{V}{n} \right)^{1/2}$$

Onde: V= variância da similaridade genética entre cada par de genótipos; e n = número total de bandas utilizadas na estimativa das similaridades.

Os indivíduos geneticamente diferentes foram identificados no dendograma a partir da estimativa do valor mínimo de similaridade, acima do qual os indivíduos são semelhantes ou divergentes. O valor máximo de similaridade significativo foi estimado pela similaridade genética média (Sgm), que tem por base o Teste de t, ao nível de 0,001% de probabilidade:

$$Sgm = 1 - \left((t)(\overline{SSij}) \right)$$

Onde: t = o valor tabelado de t com $n-2$ graus de liberdade e $\overline{SSij}$ = erro médio das comparações consideradas no dendograma.

Para agrupar os genótipos com base na similaridade genética, foi empregado o método UPGMA (*Unweigh Pair Group Method Arithmetic Average*). Também foi efetuado o método de reamostragem bootstrap com o mesmo tamanho da amostra original. Para cada nível de reamostragem, foram obtidas 3000 amostras bootstrap como recomendado por Pavlicek et al. (1999). Para tais análises foi utilizado o programa FreeTree (PAVLICEK et al., 1999) e para geração do dendograma foi utilizado o programa TreeView (PAGE, 1996)

Para o agrupamento das amostras, considerando o método de análise de coordenadas principais (ACoP), utilizou-se o software XLSTAT (ADDINSOFT, 2010), com o coeficiente de similaridade de Jaccard, obtido pelo programa FreeTree (PAVLICEK et al., 1999).

Com a matriz binária também calculou-se a porcentagem de polimorfismo obtida com cada *primer* utilizado por meio da fórmula.

$$P = \frac{nbp}{nbt} \times 100$$

Onde: P = porcentagem de polimorfismo (ou taxa de polimorfismo); nbp = número de bandas polimórficas e nbt = número de bandas total.

4- RESULTADOS E DISCUSSÃO

O uso de 31 *primers* gerou 101 bandas, das quais 30 foram polimórficas (29,7%) e 71 monomórficas (70,3%). O número de bandas geradas variou de um (*primers* B03 e IDT 05) a seis (*primers* A15 e X01), a média de bandas/*primer* e a média de bandas polimórficas/*primer* foi 3,26 e 0,97, respectivamente (Tabela 2).

TABELA 2. Relação dos *primers* RAPD com o número de bandas amplificadas nos 40 indivíduos de pinhão manso cultivados em dois municípios de Sergipe (Umbaúba e Carira).

<i>Primer</i>	NBT ^a	NBP ^b	% BP ^c	<i>Primer</i>	NBT ^a	NBP ^b	% BP ^c
A 02	2	0	0	IDT 01	3	1	33,3
A 04	3	0	0	IDT 03	2	0	0
A 10	2	0	0	IDT 05	1	0	0
A 11	5	3	60	IDT 06	3	1	33,3
A 12	4	1	25	IDT 09	4	2	50
A 13	3	2	66,7	IDT 18	5	2	40
A 15	6	0	0	K20	4	3	75
A 16	3	0	0	S01	2	0	0
A 17	4	2	50	S18	4	1	25
A 18	2	1	50	W02	3	1	33,3
A 19	5	4	80	W03	2	0	0
A 20	2	0	0	W04	3	1	33,3
B 03	1	1	100	W08	4	0	0
B 11	2	0	0	W13	4	1	25
B 18	2	0	0	W19	5	3	60
				X01	6	0	0
Total				101	30	29,7	
Média				3,26	0,97	-	

^aNBT – Número de bandas total, ^bNBP – Número de bandas polimórficas e ^c%BP – Porcentagem de bandas polimórficas.

A porcentagem de polimorfismo variou de 0 (14 *primers*) a 100%, com os *primers* A19 e B03 (Figura 3) apresentando os maiores percentuais, 80 e 100%, respectivamente.

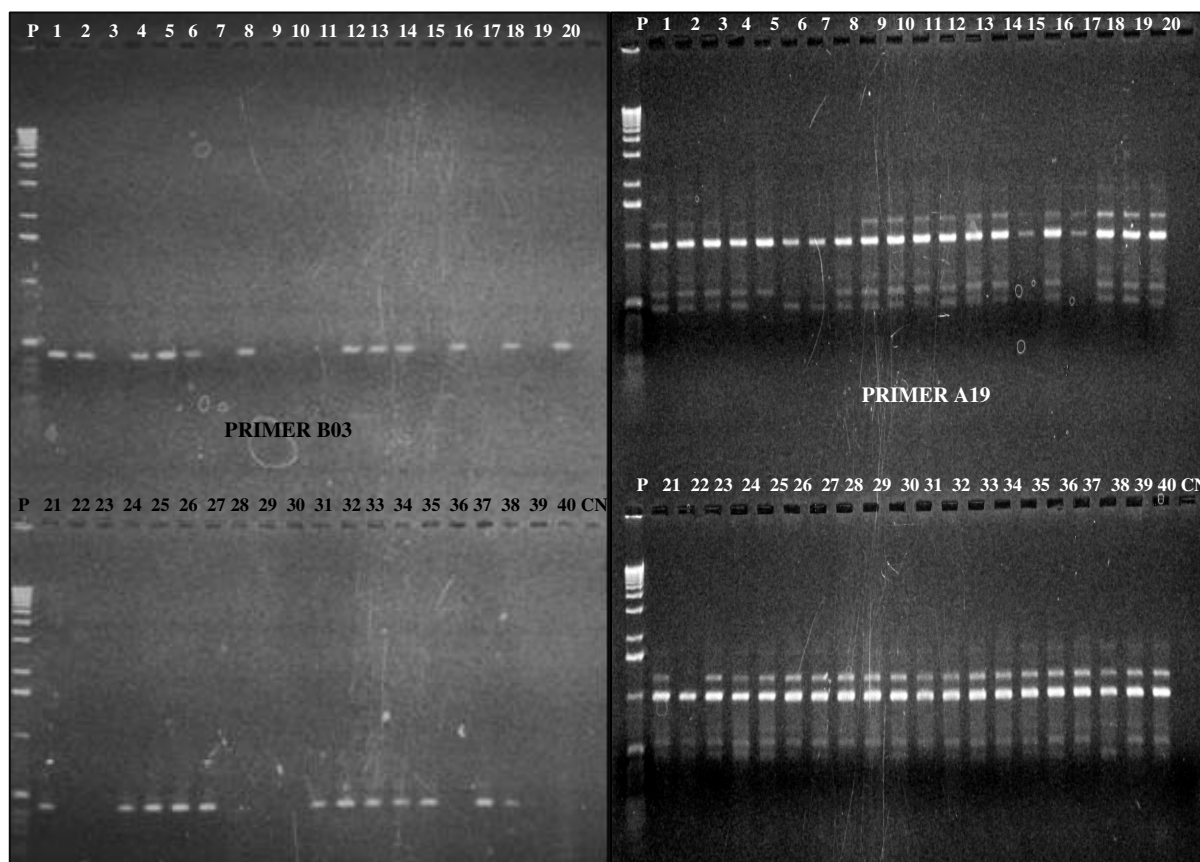


FIGURA 3. Padrões de bandejamento de indivíduos de pinhão manso obtidos, utilizando os *primers* B03 e A19. P – Padrão de peso molecular 1 kb; 1 a 20 - Umbaúba; 21 a 40 Carira e CN – Controle Negativo.

A partir dos 30 fragmentos polimórficos, gerados por 17 *primers*, foi estimada a similaridade genética, baseada no coeficiente de Jaccard, que evidenciou similaridade média entre os genótipos de 0,54 ($\pm 0,09$). A amplitude das similaridades variou de 0,18 ($\pm 0,07$) a 1,00 ($\pm 0,00$). Essa última similaridade máxima (100%) foi observada entre os genótipos 39 e 40, e a mínima entre os genótipos 5 e 36 (Tabela 3).

TABELA 3. Matriz da similaridade genética do coeficiente de Jaccard (1908) (abaixo da diagonal) e erro estimado (acima da diagonal) obtidos utilizando 17 *primers* pela técnica RAPD entre 40 genótipos de *Jatropha curcas* L. cultivados em dois municípios de Sergipe: Umbaúba (1 a 20) e Carira (21 a 40). (Similaridade média=0,55; Erro médio=0,09 e Sgm=0,67).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
1	~	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,08	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	
2	0,67	~	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,08	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	
3	0,58	0,55	~	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	
4	0,70	0,59	0,50	~	0,09	0,08	0,08	0,08	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	
5	0,33	0,45	0,33	0,56	~	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,08	0,09	0,08	0,09	0,09	0,09	0,08	0,08	0,08	0,08	0,09	0,08	0,08	0,08	0,09	0,09	0,08	0,08	0,08	0,07	0,08	0,08	0,08	0,08
6	0,63	0,52	0,59	0,72	0,39	~	0,08	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	
7	0,61	0,43	0,56	0,71	0,35	0,73	~	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	
8	0,68	0,65	0,56	0,78	0,53	0,61	0,69	~	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	
9	0,55	0,59	0,50	0,62	0,40	0,41	0,53	0,60	~	0,07	0,09	0,08	0,07	0,09	0,09	0,08	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	
10	0,50	0,68	0,52	0,64	0,43	0,50	0,48	0,62	0,80	~	0,08	0,06	0,06	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	
11	0,38	0,48	0,45	0,50	0,42	0,36	0,33	0,41	0,57	0,75	~	0,09	0,09	0,07	0,08	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	
12	0,54	0,65	0,43	0,68	0,41	0,55	0,45	0,59	0,76	0,86	0,64	~	0,06	0,09	0,09	0,08	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	
13	0,50	0,76	0,52	0,64	0,50	0,50	0,41	0,62	0,80	0,90	0,67	0,86	~	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	
14	0,45	0,50	0,33	0,60	0,53	0,38	0,35	0,50	0,60	0,70	0,82	0,67	0,70	~	0,08	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	
15	0,41	0,45	0,35	0,48	0,39	0,40	0,37	0,38	0,55	0,65	0,76	0,62	0,57	0,71	~	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09
16	0,75	0,64	0,48	0,67	0,32	0,52	0,58	0,65	0,75	0,68	0,55	0,73	0,68	0,65	0,60	~	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09
17	0,52	0,56	0,36	0,46	0,28	0,40	0,38	0,38	0,52	0,60	0,54	0,58	0,54	0,50	0,67	0,63	~	0,09	0,08	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09
18	0,42	0,46	0,38	0,37	0,35	0,31	0,23	0,35	0,54	0,50	0,57	0,54	0,56	0,52	0,48	0,52	0,58	~	0,08	0,06	0,08	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09
19	0,52	0,56	0,42	0,46	0,30	0,41	0,33	0,39	0,58	0,65	0,60	0,63	0,59	0,50	0,52	0,56	0,73	0,76	~	0,07	0,08	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	
20	0,43	0,58	0,33	0,43	0,42	0,32	0,25	0,36	0,54	0,56	0,63	0,59	0,62	0,58	0,54	0,52	0,69	0,87	0,81	~	0,08	0,08	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	
21	0,48	0,64	0,44	0,54	0,42	0,48	0,40	0,46	0,67	0,68	0,50	0,72	0,75	0,52	0,48	0,64	0,69	0,72	0,74	0,77	~	0,08	0,08	0,07	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	
22	0,31	0,40	0,25	0,42	0,47	0,29	0,32	0,33	0,55	0,50	0,50	0,48	0,50	0,52	0,48	0,46	0,58	0,68	0,64	0,74	0,74	~	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09
23	0,42	0,46	0,43	0,48	0,29	0,36	0,39	0,40	0,54	0,63	0,57	0,54	0,56	0,52	0,42	0,58	0,64	0,54	0,69	0,59	0,72	0,61	~	0,08	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09
24	0,52	0,63	0,42	0,52	0,28	0,46	0,38	0,44	0,58	0,60	0,48	0,64	0,67	0,50	0,52	0,70	0,75	0,64	0,67	0,69	0,83	0,58	0,71	~	0,07	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09
25	0,52	0,50	0,36	0,52	0,28	0,40	0,38	0,44	0,52	0,48	0,37	0,52	0,54	0,44	0,40	0,63	0,62	0,52	0,55	0,57	0,69	0,52	0,64	0,83	~	0,09	0,08	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	
26	0,37	0,36	0,32	0,37	0,24	0,31	0,19	0,30	0,32	0,44	0,50	0,43	0,44	0,46	0,36	0,41	0,52	0,60	0,57	0,59	0,54	0,42	0,60	0,58	0,64	~	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	
27	0,46	0,50	0,42	0,52	0,35	0,46	0,38	0,44	0,52	0,59	0,48	0,63	0,59	0,44	0,41	0,56	0,55	0,57	0,66	0,62	0,74	0,52	0,69	0,67	0,73	0,69	~	0,06	0,05	0,06	0,07	0,06	0,09	0,07	0,07	0,08	0,08	0,09	0,08	
28	0,36	0,39	0,36	0,41	0,28	0,35	0,32	0,33	0,46	0,54	0,42	0,52	0,48	0,33	0,40	0,44	0,56	0,46	0,61	0,52	0,63	0,46	0,64	0,56	0,62	0,64	0,88	~	0,04	0,05	0,06	0,07	0,09	0,08	0,07	0,08	0,07	0,09	0,07	0,07
29	0,39	0,43	0,40	0,44	0,27	0,38	0,36	0,37	0,50	0,58	0,46	0,56	0,52	0,37	0,38	0,48	0,54	0,50	0,64	0,55	0,67	0,50	0,68	0,59	0,65	0,68	0,92	0,95	~	0,04	0,07	0,06	0,09	0,07	0,07	0,07	0,08	0,09	0,07	0,07
30	0,36	0,44	0,42	0,41	0,28	0,35	0,32	0,38	0,46	0,60	0,48	0,52	0,54	0,38	0,35	0,44	0,50	0,46	0,61	0,52	0,63	0,46	0,71	0,56	0,62	0,71	0,88	0,91	0,95	~	0,08	0,07	0,09	0,08	0,07	0,08	0,08	0,09	0,07	0,07
31	0,39	0,43	0,30	0,44	0,32	0,38	0,31	0,37	0,44	0,52	0,36	0,56	0,52	0,37	0,38	0,48	0,54	0,45	0,53	0,50	0,67	0,44	0,56	0,59	0,65	0,62	0,84	0,87	0,83	0,79	~	0,07	0,08	0,07	0,08	0,08	0,07	0,09	0,08	0,08
32	0,43	0,41	0,33	0,48	0,31	0,37	0,35	0,41	0,48	0,50	0,39	0,54	0,50	0,41	0,32	0,52	0,52	0,54	0,62	0,59	0,70	0,54	0,72	0,63	0,76	0,72	0,88	0,83	0,88	0,83	0,80	~	0,09	0,07	0,06	0,08	0,08	0,09	0,07	0,07
33	0,40	0,33	0,29	0,35	0,21	0,39	0,25	0,27	0,30	0,37	0,36	0,41	0,37	0,38	0,39	0,44	0,50	0,46	0,45	0,46	0,52	0,40	0,46	0,56	0,63	0,73	0,68	0,63	0,67											

O valor da Sgm (similaridade genética média), desenvolvido por Skroch et al. (1992), acima do qual os indivíduos são considerados semelhantes, foi igual a 0,67 (67%). Este valor corresponde à linha de corte que foi usada como referência para analisar os agrupamentos dos indivíduos, por meio do método UPGMA (Figura 4). Com este valor, foi estabelecido que todos os agrupamentos formados à direita do corte são similares, e os obtidos à esquerda são divergentes.

A partir da Sgm, foi possível a formação de nove agrupamentos heteróticos: grupo I, formado pelo indivíduo 5, que foi o que menos se associou aos demais genótipos, com similaridade variando de 18 a 56%; grupo II, formado por 15 indivíduos de Carira (26 a 40), que tiveram amplitude de similaridade entre si de 62 a 100%; grupo III, com cinco indivíduos (17, 23, 25, 21 e 24); grupo IV, composto pelos indivíduos 18, 19, 20 e 22, com similaridade entre 64 a 87%; grupo V, formado pelos genótipos 2, 9, 10, 12 e 13, com 59 a 90% de similaridade; grupo VI, formado pelos genótipos 11, 14 e 15, com 71 a 86% de similaridade. O genótipo 3, foi o segundo mais divergente, com similaridade entre 25 a 55%, e foi agrupado no grupo VII. O grupo VIII, foi formado pelos genótipos 4, 6, 7 e 8, com 61 a 78%, e por fim, o grupo IX, composto pelos genótipos 1 e 16, que são 75% similares.

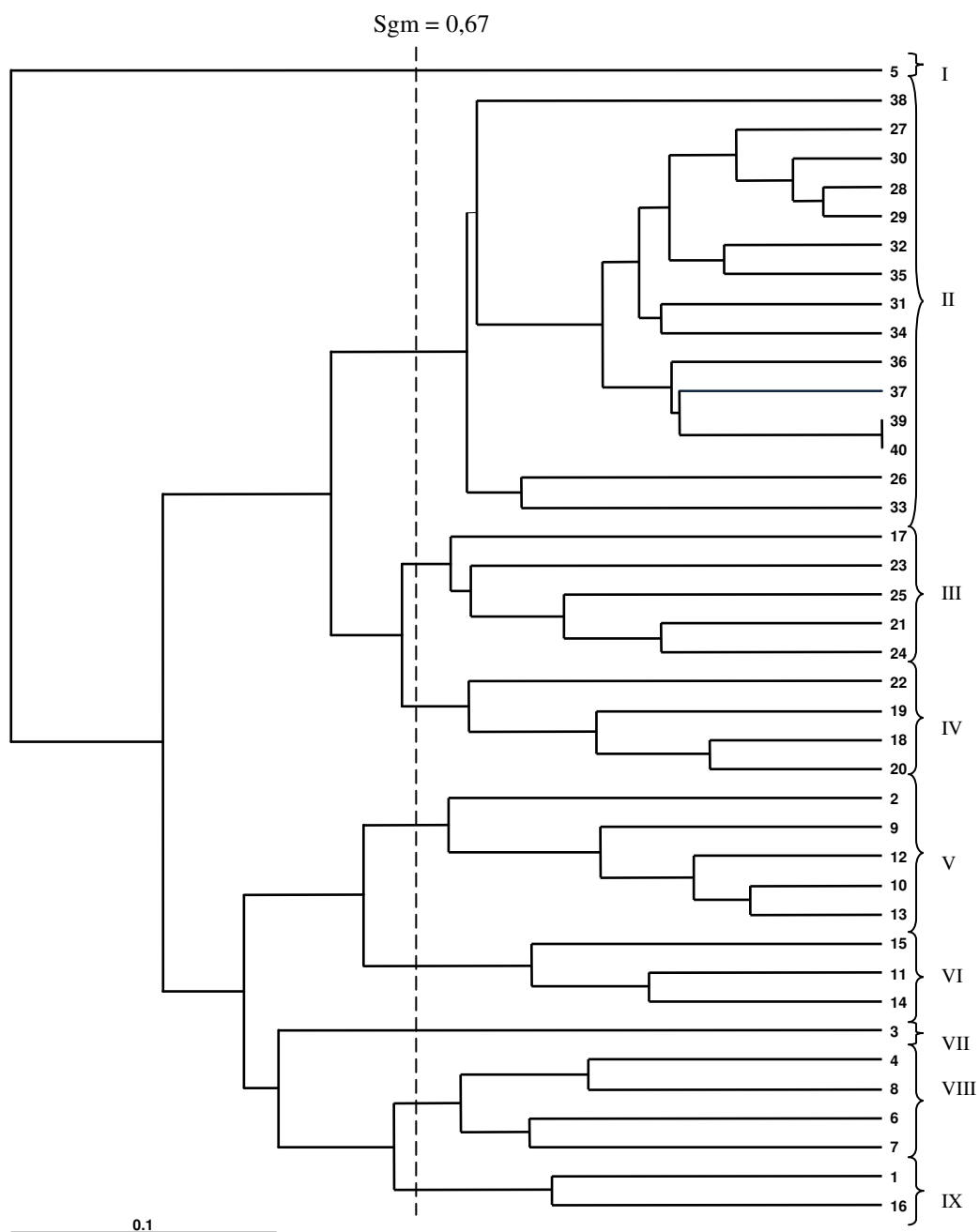


FIGURA 4. Dendrograma de similaridade genética a partir do coeficiente de Jaccard e agrupado pelo método UPGMA entre 40 genótipos de *Jatropha curcas* L. cultivados em dois municípios de Sergipe, Umbaúba (1 a 20) e Carira (21 a 40).

Considerando o método de análise por coordenadas principais (ACoP), para os dois primeiros autovalores, 39% da variância foi observada e foi possível verificar que os genótipos se agruparam de forma semelhante ao dendrograma. (Figura 5). Uma boa associação entre os dois métodos de análise (UPGMA e ACoP) foi observada na formação

de um grupo único, com o genótipo 5, e outro grupo maior (II), com 75% dos genótipos de Carira. Isso evidencia que os genótipos de Carira são os mais similares.

Os indivíduos mais divergentes foram os genótipos 3 e 5. Esses indivíduos podem ser usados para aumentar a variabilidade entre ciclos de seleção em programas de melhoramento, uma vez se constituem em fontes de alelos que não estão presentes na maioria dos indivíduos analisados.

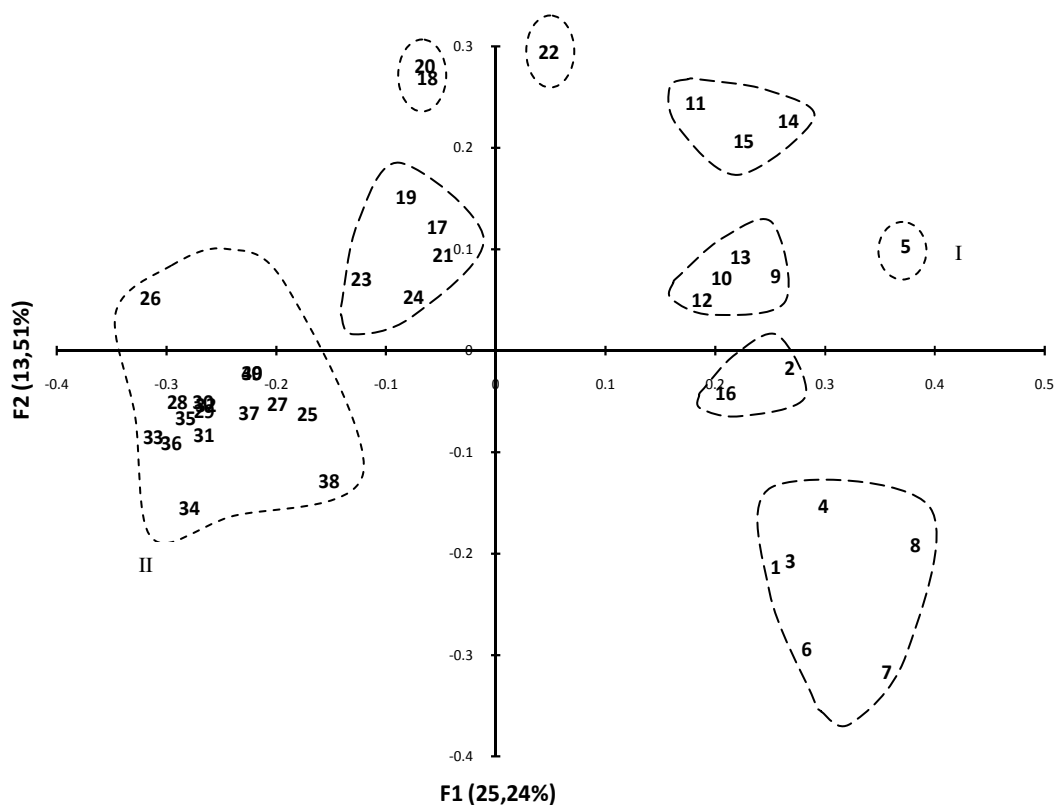


FIGURA 5. Análise de Coordenadas Principais (ACoP) a partir do coeficiente de similaridade de Jaccard para 40 genótipos de *Jatropha curcas* L. cultivados em dois municípios de Sergipe, Umbaúba (1 a 20) e Carira (21 a 40).

Apesar da formação de novo agrupamentos heteróticos a variabilidade genética encontrada nos indivíduos de *J. curcas*, cultivados em Carira e em Umbaúba, revelada por marcadores RAPD foi baixa.

O baixo nível de polimorfismo encontrado (29,7%), no presente trabalho, é corroborado por Rosado et al. (2009). Estes autores, ao caracterizarem 192 acessos de

pinhão manso do banco de germoplasma da Embrapa Agroenergia e Embrapa Cerrados, por meio de 96 *primers* RAPD, obtiveram 6,2% de bandas polimórficas, das 381 bandas amplificadas.

Basha e Sujatha (2007) encontraram um nível de polimorfismo de 42%, utilizando 400 primers de RAPD, em 42 acessos de pinhão manso da Índia e um do México. Também observaram que o acesso mexicano, não tóxico, foi o mais divergente entre todos, formando um grupo unitário. Avaliando a diversidade genética de pinhão manso oriundos de 13 países, Basha et al. (2009) obtiveram 61,8%, de polimorfismo. A variabilidade foi maior entre os acessos dos países da América Central (México e El Salvador) e menor entre os acessos dos países da Ásia e da África. Discordando destes resultados, Takikonda et al. (2009), através de AFLP, obtiveram alto polimorfismo genético (88%) entre 48 acessos coletados de seis Estados da Índia.

O pinhão manso é uma planta monóica, com 95% de polinização cruzada, feita preferencialmente por insetos (SATURNINO et al., 2005). Dessa forma, espera-se, por esse motivo, que haja uma grande heterogeneidade e distinção entre genótipos propagados por via seminal, e que apresentem heterozigosidade para a maioria dos locos (BORÉM; MIRANDA, 2005).

Nos estudos de divergência genética realizados com marcadores microssatélites foi evidenciada homozigose para a maioria dos loci, e confirmada a baixa variabilidade genética dos acessos em germoplasma do Brasil, Ásia e África, excetuando-se os acessos do México e El Salvador (SUN et al., 2008; BASHA et al., 2009; ROSADO et al., 2009).

Os resultados podem estar relacionados com a reprodução por autofecundação, facilitada pela ocorrência de plantas isoladas e à forma como a espécie foi introduzida nesses países, sendo propagadas, predominantemente, por estaquia. Alguns trabalhos reportam a existência de apomixia e de índices elevados geitonogamia (CHANG-WEI et al., 2007, PAIVA NETO et al., 2010), o que pode justificar a estreita base genética encontrada e a ocorrência de homozigose, verificada nos trabalhos com microssatélites.

Entretanto, alguns autores como Raju e Ezradanam (2002) e Saturnino et al. (2005) afirmam que no pinhão manso predomina o mecanismo de xenogamia para formação dos frutos, o que justificaria o alto polimorfismo encontrado no trabalho de Takikonda et al. (2009) e a heterozigosidade encontrada por Parmidimarri et al. (2009b).

Para elevar essa variabilidade, alguns pesquisadores têm recorrido à hibridação com outras espécies do gênero *Jatropha*. Parthiban et al. (2009), desenvolveram, com sucesso, por retrocruzamento, híbridos interespecíficos entre *J. curcas* e *J. integerrima*, dos quais, três progênies híbridas apresentaram ganhos no teor de óleo das sementes e maior resistência à seca, pragas e doenças. Basha e Sujatha (2009), também obtiveram três híbridos entre *J. gossypifolia* x *J. curcas* L., *J. curcas* x *J. integerrima* e *J. maheshwarii* x *J. curcas*. Dos quais os melhores resultados foram entre *J. curcas* e *J. integerrima*, onde houveram ganhos no tamanho das sementes e teor de óleo.

Sugere-se a caracterização dos genótipos dos outros plantios de pinhão manso em Sergipe e em Paripiranga, na Bahia, associado à análises moleculares, à caracterização com descritores morfoagronômicos de natureza qualitativa e quantitativa de interesse agrônomo tais como: produtividade, teor e qualidade do óleo, qualidade das sementes, tolerância à pragas, doenças e estresses abióticos.

5- CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho, por marcadores RAPD, evidenciam baixa diversidade genética do pinhão manso nos cultivos em Carira e Umbaúba;

Os indivíduos mais divergentes do estudo foram '3' e '5', os quais podem ser incluídos em programas de melhoramento genético para aumentar a variabilidade genética, por serem fontes de alelos que não estão presentes nos demais indivíduos;

Para maximizar a variabilidade e ganhos genéticos nos programas de melhoramento genético do pinhão manso, se faz necessário introduzir variabilidade, que pode ser encontrada em acessos do centro de origem.

6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACCARINI, J. H. Biodiesel no Brasil: estágio atual e perspectivas. **Bahia Análise & Dados**, Salvador, v.16, n.1, p.51-63, 2006.

ADDINSOFT. **XLSTAT statistical analysis software, versão 2010**. Disponível em: <www.xlstat.com> . Acesso:17/05/2010.

ALTIERI, M.; MASERA, O. Desenvolvimento rural sustentável na América Latina: construindo de baixo para cima. In: ALMEIDA, J.; NAVARRO, Z. (Eds.). **Reconstruindo a agricultura**: idéias e ideais na perspectiva do desenvolvimento rural sustentável. Porto Alegre: Editora da Universidade UFRGS, 1997. pp.79-105.

ARRUDA, F. P. de; BELTRÃO, N. E. de M.; ANDRADE, A. P. de; PEREIRA, W. E.; SEVERINO, L. S. Cultivo do pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) como alternativa para o semi-árido nordestino. **Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibrosas**, Campina Grande, PB. v. 8, n. 1, p. 789-799, 2004.

BASHA, S. D.; FRANCIS, G.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K.; SUJATHA, M. A comparative study of biochemical traits and molecular markers for assessment of genetic relationships between *Jatropha curcas* L. germplasm from different countries. **Plant Science**, Limerick, v. 176, p.812-823, 2009.

BASHA, S. D.; SUJATHA, M. Inter and intra-population variability of *Jatropha curcas* (L.) characterized by RAPD and ISSR markers and development of population-specific SCAR markers. **Euphytica**, Wageningen, v. 156, p. 375-386, 2007.

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

BELTRÃO, N. E. de M.; SEVERINO L. S.; VELOSO, J. F.; JUNQUEIRA, N.; FIDELIS, M.; GONÇALVES, N. P.; SATURNINO, H. M.; ROSCOE, R.; GAZZONI, D.; DUARTE, J. de O.; DRUMOND, M. A.; ANJOS, J. B. dos. **Alerta sobre o plantio de pinhão-manso no Brasil**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2006. 15p. (Embrapa Algodão, Documentos, 155).

BICALHO, K. C.; OLIVEIRA, L. E. M. de; SANTOS, J. B. dos; MESQUITA, A. C.; MENDONÇA, E. G. Similaridade genética entre clones de seringueira (*Hevea brasiliensis*), por meio de marcadores RAPD. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 5, p. 1510-1515, 2008.

BORÉM, A.; MIRANDA, G. V. **Melhoramento de plantas**. 4.ed. rev. amp. Viçosa: UFV, 2005. 525p.

CARELS, N. *Jatropha curcas*: A Review. In: KADER, J.C.; DELSENY, M. (Eds.). **Advances in Botanical Research**, v.50, p.39-86, 2009.

CARVALHO, B. C. L.; OLIVEIRA, E. A. S.; LEITE, V. M.; DOURADO, V. V. **Informações técnicas para o cultivo do pinhão-mansão no Estado da Bahia**. Salvador: EBDA, 2009. 79p.

CERQUEIRA, L. S. **Variabilidade genética e teor de óleo em mamoneira visando ao melhoramento para região de baixa altitude**. 2008. 57f. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, BA.

CHANG-WEI, L.; KUN, L.; YOU, C.; YOUNG YU, S. Floral display and breeding system of *Jatropha curcas* L. **Forestry Studies in China**, Beijing, v.9, p.114-119, 2007.

CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento). Conab realiza pesquisa inédita sobre pinhão-mansão. Disponível em: www.conab.gov.br/conabweb/index.php?PAG=73&NSN=1301. Acesso: 30/04/2010.

COSTA, M. R.; CARDOSO, E. R.; OHAZE, M. M. M. Similaridade genética de cultivares de mandioca (*Manihot esculenta*) por meio de marcadores RAPD. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras. v.27, n.1, p.158-164, 2003.

DHILLON, R. S.; HOODA, M. S.; JATTAN, M.; CHAWLA, V.; BHARDWAJ, M.; GOYAL, S. C. Development and molecular characterization of interspecific hybrids of *Jatropha curcas* x *Jatropha integerrima*. **India Journal of Biotechnology**, v. 8, p.384-390, 2009.

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

DURÃES, F. O. M.; LAVIOLA, B. G. **Pinhão Manso: matéria-prima potencial para produção de biodiesel no Brasil**. Disponível em: <<http://www.cnpae.embrapa.br/artigos-de-divulgacao/pinhao-manso-materia-prima-potencial-para-producao-de-biodiesel-no-brasil.pdf/view>>. Acesso: 28/05/2010.

EPE (Empresa de Pesquisa Energética). **Balanco Energético Nacional 2009 – Ano base 2008: Resultados Preliminares**. Rio de Janeiro: EPE, 2009. 48 p.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: DF, Embrapa Cenargen, 1998. 220p.

FRITSCHÉ, U. R.; KAMPMAN, B.; BERGSMA, G. **Better use of biomass for energy: Position Paper of IEA RETD and IEA Bioenergy**. IEA Bioenergy, 2009.

FOIDL, N.; FOIDL, G.; SANCHEZ, M.; MITTELBAACH, M.; HACKEL, S. *Jatropha curcas* L. as a source for the production of biofuel in Nicaragua. **Bioresource Technology**, New York, v. 58, p.77-82, 1996.

GOLDEMBERG, J.; LUCON, O. S. Energia e meio ambiente no Brasil. **Estudos Avançados**, São Paulo, v.21, n.59, p.7-20, 2007.

GUPTA, S.; SRIVASTAVA, M.; MISHRA, G. P.; NAIK, P. K.; CHAUHAN, R. S.; TIWARI S. K.; KUMAR, M.; SINGH, R. Analogy of ISSR and RAPD markers for comparative analysis of genetic diversity among different *Jatropha curcas* genotypes. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v.7, n. 23, p.4230-4243, 2008.

HELLER J. **Physic nut—*Jatropha curcas* L. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops.** International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy. 1996. 66 p.

IKBAL; BOORA, K. S.; DHILLON, R. S. Evaluation of genetic diversity in *Jatropha curcas* L. using RAPD markers. **India Journal of Biotechnology**, New Delhi , v.9, p. 50-57, 2010.

IEA (Internacional Energy Agency) BIOENERGY. **Sustainable and reliable energy source: A review of status and prospects.** IEA Bioenergy, ExCo: 2009. Disponível em: <<http://www.ieabioenergy.com/LibItem.aspx?id=6479>>. Acesso: 10/12/2009.

INSTITUTO DE RECURSOS MUNDIAIS. A estratégia global da biodiversidade. Curitiba: Fundação O Boticário de Proteção à Natureza, v.1, 1992. In: NASS, L. L. Utilização de recursos genéticos vegetais no melhoramento. In: NASS, L. L.; VALOIS, A. C. C.; MELO, I. S.; VALADARES-INGLIS, M. C. (Eds.). **Recursos genéticos e melhoramento - plantas.** Rondonópolis: Fundação MT, 2001. 1189p.

JBIC (Japanese Bank for International Cooperation); MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). **Estudos prospectivos para fomento dos biocombustíveis no Brasil.** Brasília, DF, 2006. 326p.

JONGSCHAAP, R.E.E.; CORRÉ, W.J.; BINDRABAN, P.S.; BRANDENBURG, W. A.; **Claims and facts on *Jatropha curcas* L.:** global *Jatropha curcas* evaluation, breeding and propagation programme. Plant Research International, Wageningen, Netherlands, 2007. 42p.

KAUSHIK, N.; KUMAR, K.; KUMAR, S.; KAUSHIK, N.; ROY, S. 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.

LACERDA, D. R.; ACEDO, M. D. P.; LEMOS FILHO, J. P.; LOVATO, M. B. A técnica de RAPD: uma ferramenta molecular em estudos de conservação de plantas. **Lundiana**, v. 3, n.2, p-87-92, 2002.

LAVIOLA, B. G. **Diretrizes para o melhoramento de pinhão-mansão visando à produção de biocombustíveis.** Disponível em: <www.cnpae.embrapa.br/artigos-de-divulgacao/diretrizes-para-pesquisa-pinhao-mansao-bruno-laviola.pdf/view> . Acesso em 11/01/2010.

MARTINS, S. R. **Agricultura, ambiente e sustentabilidade:** seus limites para América Latina. EMATER, 2001. 84p. CD-ROM.

MENDONÇA, S.; LAVIOLA, B. G. **Uso potencial e toxidez da torta de pinhão-mansão**. Brasília, DF: Embrapa Agroenergia, 2009. 8p. (Embrapa Agroenergia, Comunicado Técnico, 1).

MILACH, S. C. K. Principais tipos de marcadores moleculares e suas características. In: MILACH, S. C. K. **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre: UFRGS, 1998. p. 17-28.

MORET, A.; RODRIGUES, D.; ORTIZ, L. **Critérios e indicadores de sustentabilidade para bioenergia**. Fórum Brasileiro de Ongs e Movimentos Sociais para o Meio Ambiente e Desenvolvimento (FBOMS) 4. 2006. Disponível em: <<http://www.vitaecivilis.org.br/anexos/bioenergia.pdf>>. Acesso: 25/07/2008.

NUNES, C. F. **Caracterização de frutos, sementes e plântulas e cultivo de embriões de pinhão-mansão (*Jatropha curcas* L.)**. 2007. 78p. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

NUNES, C. F.; SANTOS, D. N. dos; PASQUAL, M.; VALENTE, T. C. T. Morfologia externa de frutos, sementes e plântulas de pinhão-mansão. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v.44, n.2, p.207-210, 2009.

OLIVEIRA, A. C. B. de; CAIXETA, E. T.; ZAMBOLIM, E. M.; ZAMBOLIM, L.; SAKIYAMA, N. S. **Aplicação técnica de marcadores moleculares no melhoramento de plantas**. Campinas: Instituto Agronômico de Campinas. 2007. 17p. (Instituto Agronômico de Campinas, Documentos, 81).

PAGE, R. D. M. TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. **Computer Applications in the Biosciences**, Oxford, v.12, p. 357–358, 1996.

PAIVA NETO, V. B. de; BRENHA, J. A. M.; FREITAS, F. B. de; ZUFFO, M. C. R.; ALVAREZ, R. de C. F. Aspectos da biologia reprodutiva de *Jatropha curcas* L. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 3, p. 558-563, 2010.

PAMIDIAMARRI, D. V. N. S.; PANDYA, N.; REDDY, M. P.; RADHAKRISHNAN, T. Comparative study of interspecific genetic divergence and phylogenetic analysis of genus *Jatropha* by RAPD and AFLP. **Molecular Biology Reports**, Dordrecht, v.36, p. 901-907, 2009a.

PAMIDIAMARRI, D. V. N. S.; SINGH, S.; MASTAN, S. G.; PATEL, J.; REDDY, M. P. Molecular characterization and identification of markers for toxic and non-toxic varieties of *Jatropha curcas* L. using RAPD, AFLP and SSR markers. **Molecular Biology Reports**, Dordrecht, v.36, p.1357-1364, 2009b.

PARTHIBAN, K. T.; KUMAR, R. S.; THIYAGARAJAN, P.; SUBBULAKSHMI, V.; VENNILA, S.; RAO, M. G. Hybrid progenies in *Jatropha* – a new development. **Current Science**, Bangalore, v. 96, n. 6, p.815-823, 2009.

PAVLICEK, A.; HRDA, S.; FLEGR, J. FreeTree – freeware program for construction of phylogenetic trees on the basis of distance data and bootstrap/jackknife analysis of the tree

robustness. Application in the RAPD analysis of genus *Frenkelia*. **Folia Biologica**, Praha, v. 45, p. 97-99, 1999.

RAJU, A. J. S.; EZRADANAM, V. Pollination ecology and fruiting behaviour in a monoecious species *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae). **Current Science**, Bangalore, v.83, p.1395-1398, 2002.

RAM, S. G.; PARTHIBAN, K. T.; KUMAR, R. S.; THIRUVENGADAM, V.; PARAMATHMA, M. Genetic diversity among *Jatropha* species as revealed by RAPD markers. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v. 55, p.803–809, 2008.

RANADE, S. A.; SRIVASTAVA A. P.; RANA, T. S.; SRIVASTAVA, J.; TULI, R. Easy assessment of diversity in *Jatropha curcas* L. plants using two single-primer amplification reaction (SPAR) methods. **Biomass & Bioenergy**, v.32, p.533-540, 2008.

ROSADO, T. B.; LAVIOLA, B. G.; PAPPAS, M. C. R.; BHERING, L. L.; QUIRINO, B. F.; GRATTAPAGLIA, D. **Avaliação da diversidade genética do banco de germoplasma de pinhão-mansão por marcadores moleculares**. Brasília: Embrapa Agroenergia, 2009. 16p. (Embrapa Agroenergia, Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 1).

SATURNINO, H. M.; PACHECO, D. D.; KAKIDA, J.; TOMINAGA, N; GONÇALVES, N. P. Cultura do pinhão-mansão (*Jatropha curcas* L.). **Informe Agropecuário**, v. 26, n. 229, Belo Horizonte, MG, p.44-78, 2005.

SCHUSTER, I.; CRUZ, C. D. **Estatística genômica aplicada a populações derivadas de cruzamentos controlados**. 2.ed. rev. Viçosa: UFV, 2008. 568p.

SINGH, R. N.; VYAS, D. K.; SRIVASTAVA, N. S. L.; NARRA, M. SPRERI experience on holistic approach to utilize all parts of *Jatropha curcas* fruit for energy. **Renewable Energy**, v.33, p.1868-1873, 2008.

SKROCH, P.W.; TIVANG, J.; NIENHUIS, J. Analysis of genetic relationships using RAPD marker data. **Proceedings of IUFRO International Conference**, Cali, v.2, n.3, p.23-30, 1992.

SLUSZZ, T.; MACHADO, J. A. D. Características das potenciais culturas matérias-primas do biodiesel e sua adoção pela agricultura familiar. In: Congresso Internacional sobre Geração Distribuída e Energia no Meio Rural, 6., 2006. Campinas, SP. **Anais...** Campinas, SP: AGROENERGIA GD, UNICAMP, v. único, 2006. p.1-10

SMIDERLE, O. J.; KROETZ, V. J. **Produção de mudas de pinhão manso propagadas por estaquia**. Boa Vista: Embrapa Roraima 2008. 6p. (Embrapa Roraima: Comunicado Técnico, 22).

SUBRAMANYAM, K.; MURALIDHARARAO, D.; DEVANNA, N. Genetic diversity assessment of wild and cultivated varieties of *Jatropha curcas* (L.) in India by RAPD analysis. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 8, n. 9, p. 1900-1910, 2009.

SUN, Q. B.; LI, L. F.; LI, Y.; WU, G. J.; GE, X. J. SSR and AFLP markers reveal low genetic diversity in the biofuel plant: *Jatropha curcas* in China. **Crop Science**, Madison, v.48, . p. 1865-1871, 2008.

SUNIL, N.; VARAPRASAD, K.S.; SIVARAJ, N.; SURESH KUMAR, T.; ABRAHAM, B.; PRASAD, R.B.N. Assessing *Jatropha curcas* L. germoplasme in-situ – A case study. **Biomass & Bioenergy**, 32, p.198-202, 2008.

TAKIKONDA, L.; WANI, S. P.; KANNAN, S.; BEERELLI, N.; SREEDEVI, T.; K.HOISINGTON, D.A.; DEVI, P.; VARSHNEY, R. K. AFLP-based molecular characterization of an elite germplasm collection of *Jatropha curcas* L. a biofuel plant. **Plant Science**, Limerick, v.176, p.505-513, 2009.

VILELA-MORALES, E. A.; VALOIS, A. C. C. Recursos genéticos vegetais autóctones e seus usos no desenvolvimento sustentável. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, Brasília, DF, v.17, n.2, p.11-42, 2000.

VICENTE, M. C. de; GUZMÁN, F. A.; ENGELS, J.; RAO, V. R. Genetic characterization and its use in decision making for the conservation of crop germplasm. In: The Role of Biotechnology, 2005, Turin. **Proceedings...**Turin, 2005. p.121-128.

WEN, M.; WANG, H.; XIA, Z., ZOU, M., LU, C.; WANG, W. Development of EST-SSR and genomic-SSR markers to assess genetic diversity in *Jatropha curcas* L. **BMC Research Notes**, v.3, n.42, 2010. 8p.

WIESENHÜTTER, J. **Use of the physic nut (*Jatropha curcas* L.) to combat desertification and reduce poverty**: possibilities and limitations of technical solutions in a particular socio-economic environment, the case of Cape Verde. Deutsche Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit (GTZ) - Convention Project to Combat Desertification (CCD Project), Bonn, Germany, 2003. 13p.

WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v.18, n.22, p.6531-6535, 1990.