

SULIMARY OLIVEIRA GOMES

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR EM ACESSOS DE PINHÃO MANSO
(*Jatropha curcas* L.) POR MEIO DE MARCADORES ISSR**

TERESINA

2013

SULIMARY OLIVEIRA GOMES

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR EM ACESSOS DE PINHÃO MANSO
(*Jatropha curcas* L.) POR MEIO DE MARCADORES ISSR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí, para a obtenção do Título de Mestre em Agronomia, área de concentração: Produção Vegetal.

TERESINA

2013

SULIMARY OLIVEIRA GOMES

Engenheira Agrônoma

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR EM ACESSOS DE PINHÃO MANSO
(*Jatropha curcas* L.) POR MEIO DE MARCADORES ISSR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí, para a obtenção do Título de Mestre em Agronomia, área de concentração: Produção Vegetal.

Orientadora: Profa. Dra. Regina Lucia Ferreira Gomes

Co-orientador: Dr. Paulo Sarmanho da Costa Lima

TERESINA

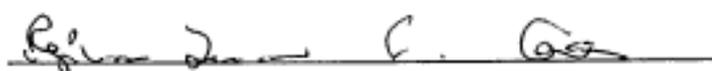
2013

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR EM ACESSOS DE PINHÃO
MANSO (*Jatropha curcas* L.) POR MEIO DE MARCADORES ISSR**

SULIMARY OLIVEIRA GOMES
Engenharia Agrônoma

Aprovada em 28/02/2013

Comissão Julgadora:



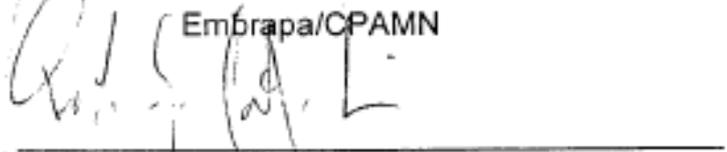
Dra. Regina Lucia Ferreira Gomes – Presidente
CCA/UFPI



Dra. Nair Helena Castro Arriel - Titular
Embrapa Algodão/PB



Dr. Marcos Emanuel da Costa Veloso – Titular
Embrapa/CPAMN



Dr. Paulo Sarmanho da Costa Lima – Titular (Co-orientador)
Embrapa/CPAMN

A Fé é o fundamento da esperança, é uma certeza a respeito do que não se vê.

Hebreus, 11, 1

À Trindade Santa, aos queridos Santos e Anjo de Devoção: Nossa Senhora da Conceição Aparecida, São Francisco de Assis e São Miguel Arcanjo.

OFEREÇO

À minha mãe, Fátima, aos amados irmãos Sullivan, Sulleandro, Suldblano e Vinicíos; aos sobrinhos Victória, Lucas e Joffre Júnior; ao noivo Everaldo Moreira da Silva.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Ti Senhor, por todo Amor e Proteção em minha Vida e em especial nessa etapa;

À Universidade Federal do Piauí, pela oportunidade de realização do curso;

À Embrapa Meio-Norte, pelo apoio total na condução da pesquisa;

À FINEP, PETROBRAS, EMBRAPA - Projeto Fontes Alternativas, pelo financiamento do trabalho e concessão da bolsa;

À professora Dra. Regina Lucia Ferreira Gomes, pelos inúmeros incentivos, ensinamentos, confiança e, sobretudo, pela amizade;

Ao pesquisador Dr. Paulo Sarmanho da Costa Lima, pela orientação, por todo cuidado na condução da pesquisa e pelos ensinamentos;

Ao pesquisador Dr. Marcos Emanuel da Costa Veloso, pela sincera recepção no projeto, pelos esclarecimentos e incentivos;

A pesquisadora da Embrapa Algodão, Dra. Nair Helena Castro Arriel, por aceitar participar do trabalho e por disponibilizar amostras de material vegetal;

Ao pesquisador Dr. Diógenes Manoel Pedrosa de Azevedo, responsável pelo Banco de Germoplasma de Pinhão Manso da Embrapa Meio-Norte, pelo empenho e dedicação.

Ao professor Dr. Sérgio Emílio dos Santos Valente, por confiar seus trabalhos e pela prontidão em nos ajudar. E a seus colaboradores Camila Campêlo, João Paulo Gomes Viana, Marcones Ferreira Costa e aos alunos de Iniciação Científica;

Aos professores da Pós-Graduação pelos ensinamentos compartilhados e ao secretário do PPGA, Vicente de Sousa Paulo, pelo apoio;

Na pessoa do Técnico Leonardo Furtado, agradeço a todos os funcionários da Embrapa Meio-Norte que contribuíram no desenvolvimento e conclusão da pesquisa;

Aos meus familiares, pelo amor incondicional, compreensão durante esses anos de estudo e por fazer de nossas conquistas verdadeiro troféu. Sem vocês nada teria sentido;

Ao Everaldo Moreira da Silva, pelo Amor e Respeito. Obrigada por se fazer presente nestes anos de distância, e por ser esse amigo fiel;

A família “Residência Universitária I” e as meninas Marie, Elvania, Rita, Elcilene e Silvana, com quem dividi os mais variados sentimentos durante esses anos de moradia;

Aos estagiários e bolsistas 2010 e 2011 do Projeto feijão-fava, pelo afeto e amizade;

Aos queridos do mestrado, em especial as turmas 2010 e 2011. Encontrei nesse grupo a alegria de celebrar a amizade e a força necessária para superar os momentos tensos;

Aos amigos do Lab. Biologia Molecular, por todo companheirismo! Isis, Michelli, Mairana, Cíntia, Gizelle, Karine, Raul, João Paulo e Geice. Obrigada mesmo pela força;

Aos amigos Daniel, Luciana, Cecília, e demais componentes do Ministério Jovem;

E a todos que contribuíram de forma direta ou indireta para a realização desse trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO	ix
ABSTRACT	x
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE TABELAS	xii
1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 Classificação botânica do pinhão manso (<i>Jatropha curcas</i> L.).....	15
2.2 Origem e distribuição geográfica	15
2.3 Características e usos da planta	16
2.4 Potencial para a produção de matéria-prima para biodiesel	18
2.5 Conservação e diversidade genética da espécie	20
2.6 Marcadores ISSR (<i>Inter Simple Sequence Repeats</i>).....	22
3 MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1 Material Vegetal	25
3.2 Extração e quantificação de DNA	31
3.3 Seleção de <i>primers</i> e reação ISSR.....	31
3.4 Análises estatísticas	32
4 RESULTADOS	36
4.1 Análise da diversidade genética	36
4.2 Análise de agrupamento	39
4.3 Estrutura genética	42
5 DISCUSSÃO	42
6 CONCLUSÕES	47
REFERÊNCIAS	48

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR EM ACESSOS DE PINHÃO MANSO (*Jatropha curcas* L.) POR MEIO DE MARCADORES ISSR

Autora: Sulimary Oliveira Gomes
Orientadora: Profa. Dra. Regina Lucia Ferreira Gomes
Co-orientador: Pesq. Dr. Paulo Sarmanho da Costa Lima

RESUMO

O pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) é um arbusto da família Euphorbiaceae, que vem se destacando como uma das plantas oleaginosas promissora para a produção de óleo para o biodiesel no Brasil. Este estudo teve por objetivo realizar a caracterização molecular por meio de marcadores ISSR em diferentes populações de pinhão manso, provenientes do Banco Ativo de Germoplasma (BAG) da Embrapa Meio-Norte, Piauí e Embrapa Algodão, Paraíba. Foram testados 100 *primers* ISSR, desses 11 foram usados na genotipagem. Obteve-se 307 locos ISSR, sendo 294 polimórficos, com média de 27 locos por *primer*. A percentagem média de locos polimórficos (P%) foi de 95,76%. A diversidade genética de Nei (H_e) e índice de diversidade de Shannon (H_o) variaram de $H_e = 0,0256$ a $0,1703$ e $H_o = 0,0374$ a $0,1926$, respectivamente. O número de alelos observados (N_a) variou de 1,0619 a 1,3257, já o número efetivo de alelos (N_e) variou de 1,0438 a 1,1496. O valor do coeficiente de diferenciação genética (G_{ST}) foi de 0,6306 entre as populações. Na AMOVA ($\Phi_{ST} = 0,4452$) e no Φ_{ST} *pairwise*, verificou-se que houve diferenciação genética, sendo a diversidade genética total dividida em 44,52% entre as populações e 55,48% dentro das populações. O dendrograma (UPGMA) formou quatro grupos bem definidos. Concluiu-se que o BAG de Pinhão Manso da Embrapa Meio-Norte apresenta variabilidade genética; os Estados do PI, MA, CE, BA, MG possuem populações com variabilidade genética em pinhão manso; no Estado do Piauí há concentração de variabilidade genética nas mesorregiões Norte Piauiense, Centro-Norte Piauiense e Sudoeste Piauiense; as populações de Campo Maior-PI e Agricolândia-PI são as mais divergentes e Parnaíba-PI e Chaval-PI as mais similares; a maior variabilidade genética da espécie está presente dentro das populações; os cruzamentos entre os acessos CMN 58 e CMN NP; CMN 7/7 e CMN NP; CMN 333 e CMN 10/26; CMN 333 e CMN 58; CMN 16 e CMN 7/7; CMN NP e CMN 10/26; CMN 333 e CMN 26 constituem a melhor combinação para programas de melhoramento.

Palavras – chave: Diversidade genética, Recursos genéticos, Biodiesel, Oleaginosa.

**MOLECULAR CHARACTERIZATION IN ACCESSES OF JATROPHA
(*Jatropha curcas* L.) THROUGH ISSR MARKERS**

Author: Sulimary Oliveira Gomes

Adviser: Teacher. Dra. Regina Lucia Ferreira Gomes

Co- adviser: Res. Dr. Paulo Sarmanho da Costa Lima

ABSTRACT

Jatropha (*Jatropha curcas* L.) is a shrub of family, which has been highlighted as one of the promisor oilseed plants for Euphorbiaceae biodiesel production in Brazil. This study aimed to perform the molecular characterization using inter sample sequence repeats (ISSR) markers in different populations of *Jatropha*, from active germoplasm bank of both Embrapa Meio-Norte, Piauí and Embrapa Algodão, Paraíba. We tested 100 primers ISSR, eleven of them used in genotyping, providing us 307 ISSR loci of which 294 were polymorphic with a mean of 27 loci per primer. The average percentage of polymorphic loci (P%) was 95,76%. The Nei's genetic diversity (H_e) and the Shannon's index (H_o) reached variation of $H_e= 0,0256$ to 1,703 and $H_o= 0,0374$ to 0,01926, respectively. The number of observed alleles (N_a) varied from 1,0619 to 1,3257, whilst the number of effective alleles (N_e) varied from 1,0438 to 1,1496. The coefficient value of genetic differentiation (G_{ST}) was 0,6306 among the populations, revealing high genetic differentiation. Both AMOVA ($\Phi_{ST} = 0,4452$, $P < 0,001$) and Φ_{ST} pairwise revealed that there were genetic differentiation of *jatropha*, being the overall genetic diversity divided at 44,52% among the populations and 55,48% inside the populations. The dendrogram (UPGMA) formed four very distinct groups. It was concluded that the BAG of *Jatropha* Embrapa Mid-North genetic variability, the states of the PI, MA, CE, BA, MG have populations with genetic variability in *jatropha*, in the State of Piauí no concentration of genetic variability in the regions Piauense North, North Central and Southwest Piauí Piauí; populations of Campo Maior-Agricolândia-PI and PI are the most divergent and Parnaíba-PI and PI-Chaval the most similar, the greater genetic variability is present within populations; crosses between accessions CMN CMN 58 and NP; CMN 7/7 and NP CMN, CMN 333 and CMN 10/26; CMN 333 and CMN 58; CMN CMN 16 and 7/7, and NP CMN CMN 10/26; CMN CMN 333 and 26 are the best combination for breeding programs.

Keywords: Genetic diversity, Genetic resources, Biodiesel, Oilseed.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Localização indicando os locais de procedência dos acessos, Teresina, PI, 2013.....25**
- Figura 2 - Perfil de amplificação do *primer* UBC 818 em 27 acessos de pinhão manso. 1 a 25 - populações do Piauí; 26 e 27 - populações do El Salvador. Teresina, PI, 2013.....37**
- Figura 3 - Perfil do tamanho das bandas amplificadas a partir do *primer* UBC 856, Teresina, PI, 2013.....37**
- Figura 4 - Dendrograma de similaridade genética a partir do coeficiente de Jaccard com agrupamento pelo método UPGMA entre 97 acessos de *Jatropha curcas* L. pertencentes ao BAG da Embrapa Meio-Norte, Piauí e Embrapa Algodão, Paraíba.....41**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Acessos de pinhão manso, com a respectiva identificação e procedência, Teresina, PI, 2013.....	26
Tabela 2 - <i>Primers</i> utilizados na caracterização molecular, temperatura de <i>melting</i> (Tm), temperatura de anelamento (Ta), sequência e percentual de GC, Teresina, PI, 2013.....	31
Tabela 3 - Análise de variância molecular (AMOVA)	34
Tabela 4 - Locos amplificados e locos polimórficos gerados por 11 <i>primers</i> ISSR, Teresina, PI, 2013.....	36
Tabela 5 – Parâmetros genéticos estimados entre 29 populações de pinhão manso, Teresina, PI, 2013.....	38
Tabela 6 - Análise de variância molecular (AMOVA) em 29 populações de pinhão manso. Teresina, PI, 2013.....	42

1 INTRODUÇÃO

As mudanças climáticas que vêm ocorrendo nos últimos anos têm contribuído para o aquecimento global, oriundo, principalmente, da geração e emissão antrópicas dos gases do efeito estufa. Por isso, há uma preocupação em criar novas fontes de energia limpa e renovável, que possam substituir os combustíveis fósseis por biocombustíveis como o biodiesel.

A produção de óleo para o biodiesel, a partir do pinhão manso (*Jatropha curcas* L.), é de grande importância para o desenvolvimento regional, especialmente para o Nordeste, pela sua capacidade de gerar renda e melhoria na qualidade de vida no meio rural.

O pinhão manso é um arbusto da família Euphorbiaceae, que vive mais de 50 anos, sendo encontrado praticamente em todas as regiões do Brasil, nas mais diferentes condições edafoclimáticas e vem se destacando como uma das plantas oleaginosas promissoras para a produção de biodiesel. A espécie encontra-se em processo de domesticação e há uma grande demanda por informações técnica e científica, principalmente, pelos empresários, para a produção de matéria-prima para as indústrias de biodiesel. No Brasil, o pinhão manso tem despertado interesse dos produtores, do governo e das instituições de pesquisas, gerando assim expectativa para o seu plantio, inclusive no semiárido nordestino.

Apesar de toda importância econômica e social ligada ao cultivo do pinhão manso, os estudos ainda estão na fase inicial. Até o momento, são poucas as informações disponíveis sobre seu cultivo e base genética. Atualmente, os materiais de pinhão manso utilizados em plantios comerciais no Brasil são geneticamente desconhecidos. Nesse contexto, a espécie deve ser estudada de modo mais detalhado, principalmente no âmbito molecular.

Os estudos de caracterização molecular conduzidos por Sun et al. (2008) e Pamidimarri et al. (2010), realizados respectivamente nos BAG da China e Índia, demonstraram baixa variabilidade. No Brasil, Rosado et al. (2009) tiveram conclusão similar. Contudo, He et al. (2007) encontraram alto nível de diversidade genética entre oito populações de pinhão manso usando marcadores ISSR. Grativol et al. (2011), ao trabalhar com marcadores ISSR, concluíram que os acessos brasileiros estudados possuem alto polimorfismo (91%) e alta diversidade genética (0,4340). Esses resultados mostram alta diversidade genética, em comparação com os acessos de outros países.

A caracterização molecular atua de modo eficiente, pois permite avaliar a variabilidade genética entre indivíduos em nível de DNA, sendo capaz ainda, de associar a similaridade entre grupos (MELCHINGER et al., 1994). Os marcadores moleculares permitem conclusões consistentes quanto à relação genética entre cultivares, espécies e híbridos intra e interespecíficos, e também na construção de mapas genéticos (BORÉM e CAIXETA, 2009).

Dentre os marcadores moleculares disponíveis, os *Inter Simple Sequence Repeats* (ISSR) são amplamente utilizados em estudos de diversidade genética e estruturação genética populacional (CHRISTOPOULOS et al., 2010). Esses marcadores são amplificados via reação em cadeia da polimerase (PCR) de regiões do DNA genômico, que compreendem dois microssatélites idênticos, adjacentes e inversamente orientados (ASSEFA; MERKER; TEFERA, 2003; ZIETKIEWICZ; RAFALSKI; LABUDA, 1994), os mesmos possuem como características a longa sequência dos *primers* e a alta temperatura de anelamento, o que aumenta a confiabilidade e reprodutibilidade dos resultados obtidos (BORNET; BRANCHARD, 2001).

Diante do exposto, o objetivo deste estudo foi realizar a caracterização molecular por meio de marcadores ISSR em diferentes populações de pinhão manso, provenientes do Banco Ativo de Germoplasma (BAG) da Embrapa Meio-Norte, Piauí e Embrapa Algodão, Paraíba.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Classificação botânica do pinhão manso (*Jatropha curcas* L.)

O pinhão manso pertence à família Euphorbiaceae, subfamília Crotonidae, Tribo Hippomaneae, subtribo Jatrophae, gênero *Jatropha* e a espécie *Jatropha curcas* L.. A família Euphorbiaceae possui cerca de 8000 espécies, com aproximadamente 320 gêneros, enquanto que o gênero *Jatropha* contém 170 espécies de plantas herbáceas e arbustivas (WEBSTER, 1994; HELLER, 1996), sobre as quais, têm-se registros de aplicação em uso medicinal, ornamental e na produção de óleo.

A espécie *Jatropha curcas* L. possui elevado valor medicinal e representa uma oleaginosa bastante promissora para a produção de biodiesel, sendo considerada mais uma opção agrícola para a região Nordeste, por ser tolerante à seca (ARRUDA et al., 2004).

O nome *Jatropha* é de origem grega, iatrós (doutor) e trophé (comida) o que significa ‘uso medicinal’ (HELLER, 1996). Dependendo do local de ocorrência o pinhão manso pode ser conhecido como pinhão branco, pinhão do Paraguai, purgueira, pinha-de-purga, grão-de-maluco, pinhão-de-cerca, pinhão-bravo, figo-do-inferno, pinhão-das-barbadas (DRUMMOND et al., 1984). Entre os ingleses é conhecido por physic nut, na França recebe o nome de pulghera, purgera, pignon de Inde, pagnon de Barbárie, noix americaine, no México é zicilte e no Egito ab el boluk (PEIXOTO, 1973).

2.2 Origem e distribuição geográfica

A origem do pinhão manso ainda não é bem definida, acredita-se que seja originário das Américas do Sul e Central, sendo o México seu centro de origem (HELLER, 1996; BASHA; SUJATHA, 2007; FAIRLESS, 2007). A distribuição dessa espécie, que ocorre principalmente nas Américas, África e na Ásia, provavelmente aconteceu por causa da presença dos navios portugueses nas Ilhas de Cabo Verde e Guiné Bissau (HELLER, 1996; OPENSHAW, 2000).

O pinhão manso é encontrado de forma espontânea em quase todas as regiões intertropicais, tendo maior ocorrência nas regiões tropicais. No Brasil, apresenta ampla distribuição geográfica, sendo encontrado de forma dispersa adaptando-se a condições edafoclimáticas variadas, ocorrendo nas regiões Sudeste, Centro-oeste e Nordeste

(PEIXOTO, 1973), devido às características de rusticidade e tolerância a estiagens (SATURNINO et al., 2005).

2.3 Características e usos da planta

O pinhão manso é uma planta perene, que possui como característica interessante sua capacidade de adaptar-se bem em locais com temperatura elevada e em clima seco.

Esse arbusto possui crescimento rápido e pode atingir de dois a cinco metros de altura (HELLER, 1996). O seu tronco encontra-se dividido desde a base em vários ramos, os quais possuem cicatrizes oriundas pela queda das folhas na estação seca (SATURNINO et al., 2005), que surgem logo após as primeiras chuvas. O diâmetro do tronco mede geralmente 0,20 m, sendo o caule liso, porém quando ferido expeli um líquido leitoso, o látex, que segundo Arruda et al. (2004), possui propriedade medicinal, sendo usado como cicatrizante, hemostático e purgante.

De modo geral, o caule do pinhão manso é pouco resistente, apresenta lenho mole e medula desenvolvida. O floema possui longos canais que se estendem até as raízes, nos quais circula o látex; suas raízes são curtas, superficiais e com pouca ramificação. As folhas do pinhão manso são verdes, esparsas e brilhantes, largas e alternas, em forma de palma com três a cinco lóbulos e pecioladas, com nervuras esbranquiçadas e salientes na face inferior (SATURNINO et al., 2005).

Quanto à reprodução, o pinhão manso é uma planta monóica, assim, encontra-se em uma mesma inflorescência flores masculinas e femininas. Comumente, as flores masculinas estão presentes em maior quantidade e ficam concentradas nas extremidades da inflorescência (SOLOMON RAJU; EZRADANAM, 2002). Como apresenta fecundação cruzada, é uma planta alógama (CARVALHO et al., 2008).

Para o melhoramento genético, a biologia floral de uma espécie é fator decisivo na condução dos estudos. Por outro lado, o florescimento apresenta uma estreita ligação com a produção, visto que o número de flores femininas e sua fecundação determinam a quantidade de frutos e sementes a serem produzidas (JUHÁSZ et al., 2009). No pinhão manso, as primeiras horas da manhã são consideradas o melhor momento para ocorrer a polinização (PAIVA NETO et al., 2010).

O fruto do pinhão manso é carnoso do tipo cápsula trilocular, e em seu interior estão dispostas as sementes, sendo geralmente uma em cada cavidade, formado por um

pericarpo ou casca dura e lenhosa, indeiscente. Normalmente, são geradas três sementes por fruto, cujo tamanho pode variar de 1,5 a 2,0 cm de comprimento, 1,0 a 1,3 cm de largura e o peso de 1,53 a 2,85 g, apresentando teor de óleo variando entre 33 e 38%, isso representa de 53 e 79% do peso do fruto (SATURNINO et al., 2005).

A composição do fruto está distribuída em 27,8% de casca, 26,2% de epicarpo e 46% de albúmen e é nesta região que se encontra o maior teor de óleo, podendo chegar a 60,8% (BRASIL, 1985). Com relação à cor, inicialmente o fruto é de tonalidade verde, passando para amarelo, depois castanho e por fim torna-se preto, no último estágio de maturação (SATURNINO et al., 2005).

Como o pinhão manso ainda se encontra em processo de domesticação há falta de cultivar desenvolvidas, assim, informações básicas de cultivo e manejo não estão bem definidas. Por este motivo, os plantios são desuniformes, principalmente, quanto à produção e maturação dos frutos. Saturnino et al. (2005) e Beltrão et al. (2006) exemplificam essa desuniformidade ao esclarecer que, em um mesmo cacho, existem frutos com idades diferentes, por causa do dia de abertura das flores femininas, existindo ainda diferenças entre época de florescimento, e isso dificulta a colheita, já que a produção uniforme viabiliza a colheita mecanizada.

Embora essas questões tenham influência na produção, tem sido observado que o pinhão manso é uma espécie com potencial produtivo. Relatos anteriores indicavam boa expectativa de produção, conforme Peixoto (1973), a produção pode variar de 1 a 6 Mg ha⁻¹, sendo essa variação ligada à idade da planta, que frequentemente, começa a produzir aos 10 meses após o plantio. Estima-se que no quarto ano seja alcançada sua estabilidade de produção, podendo estender-se até 50 anos.

A variação da produtividade de sementes para as condições brasileiras variam de 0,59 a 6,26 Mg ha⁻¹, sendo 0,59 a 5,64 Mg ha⁻¹ sem irrigação e 4,88 a 6,26 Mg ha⁻¹ para cultivos irrigados. O rendimento potencial de óleo esperado é de 203 a 2.153 Mg ha⁻¹ (LAPOLA; PRIESS; BONDEAU, 2009). Drummond et al. (1984), em ensaio experimental na região de Janaúba-MG, observaram a produção de pinhão manso com idade média de 18 meses sob condições irrigadas, registrando produção de 2,5 Mg ha⁻¹ de sementes.

De acordo com Arruda et al. (2004), a produção anual de pinhão manso não é inferior a 2 Mg de óleo ha⁻¹. O risco de variação dessa produção é atribuído a fatores como a região de plantio, método de cultivo, tratos culturais, idade das plantas,

quantidade de chuva e fertilidade do solo. Tais fatores poderão ser objetos de pesquisas, cujo aprimoramento possibilitará que a produção seja estável e tenha viabilidade econômica, evidenciando assim, a importância dos estudos com melhoramento genético para a espécie. Além disso, com a expansão das áreas de plantio, o pinhão manso tende a contribuir com a fixação do homem no campo, uma vez que a proposta de fornecer matéria-prima para a indústria é uma atividade geradora de renda.

Com relação ao uso, essa planta apresenta atributos como a boa aptidão para recuperar áreas degradadas, já que, após a extração do óleo, a torta, que é o subproduto gerado, pode ser utilizada como adubo orgânico, principalmente, por conter elevados teores de nitrogênio, fósforo e potássio (TEIXEIRA, 2005; MENDONÇA; LAVIOLA, 2009). Somando-se a isso, possuem ainda, propriedades medicinais, pode ser usada na produção de sabão e como cerca-viva (HELLER, 1996).

Sua aplicação na medicina popular tem benefício em várias enfermidades, sendo o látex rico em propriedade antimicrobiana e cicatrizante; as raízes podem ser usadas como diuréticas e antileucêmicas; enquanto que as folhas e o óleo são muito eficazes no tratamento de doenças na pele. Outra serventia do óleo é no tratamento de reumatismo. Já as sementes são nocivas a animais e ao ser humano, sua ingestão pode provocar vômito e diarreia, por causa da presença de curcina e ésteres de forbol que apresentam alta toxicidade (HELLER, 1996), bem como o ácido jatrópico (PEIXOTO, 1973).

O óleo extraído das sementes tem provocado interesse pela espécie por causa da sua alta qualidade e boa perspectiva para produção de biodiesel. Esse óleo apresenta-se incolor, inodoro, muito fluído e fácil de extrair por pressão (ARRUDA et al., 2004). Quando comparado com o óleo de outras espécies como soja, mamona e palma observa-se qualidade superior quanto à estabilidade de oxidação, viscosidade e ponto de congelamento, respectivamente (CARELS, 2009).

2.4 Potencial para a produção de matéria-prima para biodiesel

Nos últimos anos, a produção de biocombustível, derivado de óleos vegetais, tem despertado interesse em vários estudos (FREITAS et al., 2011), e nas mais variadas áreas do conhecimento. Isso acontece, principalmente, por causa dos altos índices de poluição gerada pelos combustíveis fósseis. Neste contexto, torna-se necessária a busca por novas fontes de energia que possam contornar tais problemas ambientais, bem como reduzir os riscos de sua falta.

O biocombustível atua de modo eficiente, já que o uso do biodiesel no transporte rodoviário, principalmente nos grandes centros urbanos, possui a emissão de poluente bem inferior quando comparado com o óleo diesel (MASJUK; SAPUAN, 1995). De acordo com Chang et al. (1996), as emissões de monóxido e dióxido de carbono, enxofre e material particulado do biodiesel são bem inferiores às do diesel convencional. Por este motivo, o uso do biodiesel como combustível tem alcançando lugar de destaque no cenário mundial.

No Brasil, em 2002, o Ministério da Ciência e Tecnologia lançou o Programa Brasileiro de Desenvolvimento Tecnológico de Biodiesel, em que o principal objetivo era a inclusão e o fortalecimento da agricultura familiar na cadeia produtiva da agroenergia, em especial, do biodiesel (SLUSZZ; MACHADO, 2006).

Posteriormente, com o advento do Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel (PNPB), estabelecido pela lei n. 11.097/2005, ficou determinado que a partir de janeiro de 2008 fosse obrigatório em todo o território nacional o uso da mistura B2, que significa a adição de dois por cento de biodiesel em 98% de diesel de petróleo, e posteriormente, em janeiro de 2013, deveria ser adotada obrigatoriamente a mistura B5, sendo então, adicionados cinco por cento de biodiesel ao diesel de petróleo. Dessa forma, ficou evidente a necessidade de matéria-prima para esse fim, sendo então, consolidada a demanda por óleos vegetais, já que as misturas B2 e B5 são obrigatórias.

O Brasil destaca-se por possuir áreas disponíveis para a produção em grande escala, além da vasta diversidade edafoclimática e de espécies nativas com potencial para a produção de biocombustível (TEIXEIRA, 2005), o que pressupõe desenvolvimento nas regiões brasileiras nos aspectos social, ambiental e econômico.

Entre as espécies presentes no Brasil, podem ser citadas a soja, mamona, dendê, girassol, amendoim, canola, coco, babaçu, algodão, pinhão manso, nabo forrageiro, pequi, buriti e a macaúba, com grande potencial (SLUSZZ; MACHADO, 2006). Para Arruda et al. (2004), o pinhão manso é uma espécie oleaginosa que pode ser destinada para a produção de biodiesel, podendo seu cultivo ser implantado no semiárido nordestino. Fatores como boa expectativa de produção, altos rendimento de óleo, tolerância da planta ao estresse hídrico e baixa exigência da fertilidade do solo justificam o interesse pela espécie.

2.5 Conservação e diversidade genética da espécie

O conhecimento da variação genética de uma espécie é fundamental em programas de melhoramento, pois permite a melhor utilização do banco de germoplasma, possibilita atuação mais eficiente no processo de seleção dos indivíduos (KARP; EDWARDS, 1998), permite ao melhorista identificar genes para serem incorporados nos estudos de melhoramento, e com isso prevenir a erosão genética (BUENO; MENDES; CARVALHO, 2006). Portanto, a base da conservação de espécies é a manutenção da variabilidade genética nas populações (YEEH, KANG, CHUNG, 1996).

De acordo com Borém (2001), é essencial a um programa de melhoramento a existência de variabilidade genética, de maneira que esteja à disposição para facilitar os estudos, sobretudo, na busca por características de interesse, como teor de óleo, precocidade, produção, entre outros. Paralelo a isso, é primordial as atividades de coleta, introdução, caracterização, avaliação e conservação de germoplasma.

A caracterização de germoplasma tem por objetivo registrar informações que descrevam, identifiquem e assim, diferenciem os indivíduos (VICENTE et al., 2005). Essas informações podem ser geradas a partir de descritores botânicos, morfológicos, agronômicos e moleculares.

A conservação da diversidade genética do pinhão manso ocorre, em grande parte, nos Bancos de Germoplasma, principalmente, nos países da África e China, que atualmente, se destacam em pesquisas com a espécie. De acordo com Heller (1996), instituições da Costa Rica, Burkina Faso e do Cabo Verde também realizaram coletas para a formação de germoplasma *in situ* e em bancos de sementes. Na Índia, há conservação de germoplasma *in situ* em quatro regiões ecogeográficas (SUNIL et al., 2008), havendo ainda, Banco Ativo de Germoplasma (BAG) do gênero *Jatropha* na Tailândia, Filipinas, México, Guatemala e Holanda, cujo objetivo é obter melhor compreensão da espécie (CARELS, 2009), e assim avançar nos programas de melhoramento genético.

No Brasil, as instituições Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG), Empresa Baiana de Desenvolvimento Agrícola (EBDA) e Universidade Federal de Sergipe (UFS) (CARELS, 2009), detêm a responsabilidade da composição desses bancos de germoplasma, sobre os quais têm sido realizadas as mais variadas pesquisas.

No Piauí, no município de Teresina, a Embrapa Meio-Norte vem conduzindo ensaios experimentais desde 2007. Primeiramente, foi iniciada a formação do BAG envolvendo coletas realizadas em vários municípios do Estado do Piauí. Foram realizadas expedições de coleta também nos Estados da Bahia, Ceará e Maranhão. Parte desses acessos está sendo avaliada quanto os aspectos fisiológicos, fenológicos e moleculares, além dos estudos conduzidos nas áreas de adubação, irrigação e fitossanidade.

Na Paraíba, a Embrapa Algodão também tem realizado pesquisas com essa oleaginosa. Silva et al. (2008) conduziram estudo de caracterização morfológica em 103 acessos pertencentes do BAG da Embrapa Algodão, no município de Patos, sendo os acessos provenientes de vários Estados do Brasil, tais como Pernambuco, Tocantins, Paraíba, Ceará, e também oriundos do El Salvador, Colômbia e África. Conforme Vasconcelos et al. (2010), esse BAG possui um total de 191 acessos.

Em outras regiões do país, pesquisas também estão sendo desenvolvidas. Laviola et al. (2009) caracterizaram quanto aos aspectos morfo-agronômico um total de 185 acessos de pinhão manso implantados no BAG em Planaltina – DF, sendo este banco resultado de uma parceria entre Embrapa Agroenergia e Embrapa Cerrados. Conforme Laviola et al. (2010), esse BAG reúne cerca de 200 acessos oriundos de diversas regiões do Brasil, sendo os mesmos submetidos à avaliação em programa de melhoramento, a fim de se obter materiais com alta produtividade de grãos e teor de óleo, bem como, materiais sem constituintes tóxicos.

Informações sobre a base genética do germoplasma disponível têm sido obtidas com base em marcadores moleculares. Na China, foram caracterizados 54 acessos locais e dois da Malásia, por marcadores AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) e SSR (*Simple Sequence Repeats*) (SUN et al., 2008). O estudo de Basha et al. (2009), usou acessos coletados na Índia, China, Cabo Verde, Egito, Madagascar, África, Uganda, Filipinas, Tailândia, Vietnã, México e El Salvador. No Brasil, Rosado et al. (2009) caracterizaram, por RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) e SSR, 192 acessos de pinhão manso de mais de 40 regiões do país. Grativol et al. (2011) também realizaram a caracterização molecular em 332 acessos provenientes de oito estados do Brasil.

2.6 Marcadores ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*)

Os marcadores moleculares são usados como ferramentas de apoio a programas de melhoramento genético com objetivo de proporcionar maior eficiência na transferência de fatores genéticos. Esses marcadores são ferramentas úteis para detectar variações no genoma e aumentar o poder da análise genética das plantas (BORÉM e CAIXETA, 2009). A diferença entre os tipos de marcadores moleculares está basicamente na tecnologia utilizada, no custo, na facilidade de uso, na repetibilidade e reprodutibilidade dos dados gerados.

Os marcadores ISSR atendem esses requisitos, por esse motivo são amplamente usados, em razão da eficiência na análise da variabilidade genética (ROSSI et al., 2009), bem como, em aplicações na genética de populações, no estudo de fluxo gênico, análise de paternidade e identificação de cultivares (REDDY; SARLA; SIDDIQ, 2002), e ainda, em estudos filogenéticos, mapeamento genético e biologia evolucionária.

A técnica consiste na amplificação, via PCR, de regiões do DNA genômico, presente entre duas sequências idênticas de microssatélites orientadas em direções opostas (BORNET; BRANCHARD, 2001; REDDY; SARLA; SIDDIQ, 2002). Os *primers* podem conter repetições di-, tri-, tetra- ou penta-nucleotídicas, e podem estar desancorados ou ancorados na extremidade 5' ou 3' por 1 a 4 bases degeneradas (ZIETKIEWICZ; RAFALSKI; LABUDA, 1994; GUPTA et al., 1994). O comprimento desses *primers* varia entre 16 a 25 pares de bases (pb) e o tamanho dos produtos amplificados concentra-se entre 200 a 2000 pb, tanto em gel de poliacrilamida quanto em gel de agarose (REDDY; SARLA; SIDDIQ, 2002).

Em função do método de ISSR ser uma técnica simples, eficiente, possuir alta reprodutibilidade, repetibilidade e principalmente por gerar altos índices de polimorfismo, seu uso vem sendo cada vez mais comum. Adicionalmente, quando *primers* ancorados na região 5' são utilizados, os produtos de amplificação incluem a sequência de microssatélite e suas variações de tamanho no genoma, desse modo, fornecem maior grau de polimorfismo e o número de bandas também aumenta (REDDY; SARLA; SIDDIQ, 2002). As repetições di-nucleotídicas, quando ancoradas na região 3' ou 5' também revelam alto polimorfismo (BLAIR; PANAUDO; MCCOUCH, 1999; JOSHI et al., 2000).

A adição dos nucleotídeos ancorados torna o anelamento do *primer* e a extremidade dos microssatélites mais específica e reprodutível, já que o nucleotídeo

ancorado atua para evitar o deslizamento da enzima polimerase no momento da amplificação via PCR (WOLFE; LISTON, 1998; BARTH; MELCHINGER; LUBBERSTEDT, 2002).

Para fazer uso dessa técnica não é exigido conhecimento prévio do genoma, porém, mesmo os marcadores ISSR sendo dominante, a análise pode ser utilizada para analisar locos múltiplos em uma única reação (GOULÃO; OLIVEIRA, 2001; GONZÁLEZ; COULSON; BRETTELL, 2002). Além destas características, os *primers* possuem alta temperatura de anelamento (T_a), que costuma variar de 45 a 65°C, sendo sua otimização influenciada pela quantidade de guanina e citosina (GC) presente no *primer* (REDDY; SARLA; SIDDIQ, 2002). Estes marcadores superam limitações dos marcadores RAPD, AFLP, SSR que apresentam respectivamente baixa reprodutibilidade, alto custo e necessidade de conhecimento prévio das sequências alvo para desenvolver *primers* específicos (ZIETKIEWICZ; RAFALSKI; LABUDA, 1994; GUPTA et al., 1994; REDDY; SARLA; SIDDIQ, 2002).

A natureza dominante do marcador é considerada uma limitação, pois a presença da banda pode representar o homozigoto dominante ou o heterozigoto, admitindo-se que sua ausência seja o homozigoto recessivo, entretanto, a presença ou não da banda pode estar relacionada com ocorrência de inserções ou deleções no sítio de ligação do *primer* (ZIETKIEWICZ; RAFALSKI; LABUDA, 1994; CULLEY; WOLFE, 2001). Pelo fato desse marcador possuir alta repetibilidade e reprodutibilidade aumenta-se a confiabilidade dos dados gerados (GOMES; MENDES; LIMA, 2012; MENDES; GOMES; LIMA, 2012).

Entre os marcadores que podem estimar a diversidade genética, observa-se o uso frequente de marcadores dominantes como ISSR, RAPD e AFLP. Isso ocorre devido à capacidade que os marcadores possuem para detectar polimorfismo sendo importantes em estudos de variabilidade genética (BORÉM e CAIXETA, 2009).

Ao utilizar marcadores ISSR no estudo da variabilidade genética entre os acessos de espécies de *Manihot*, Silva et al. (2011) encontraram divergências genéticas intra e interespecíficas com polimorfismo de 89,7% e Mühlen; Martins; Ando (2000) obtiveram 97,96% de polimórficos, o que identifica, como eficiente, o marcador ISSR.

Nos últimos anos, foram realizados com pinhão manso, vários trabalhos de caracterização molecular usando os marcadores ISSR, dentre eles, He et al. (2007),

Kumar e Sharma (2008), Vijayanand et al. (2009), Cai et al. (2010), Tanya et al. (2011) e Grativol et al. (2011).

Dentre os trabalhos citados, destacam-se He et al. (2007) e Grativol et al. (2011) em que a variabilidade existente foi bem acima das encontradas usualmente. No Brasil, os estudos com o pinhão manso têm sido mais discutidos nos últimos anos, porém, já foi encontrado polimorfismo de 91% em acessos brasileiros, sendo superior ao polimorfismo de 61% encontrado em acessos de países do continente Africano, Asiático e da América Central (BASHA et al., 2009; GRATIVOL et al., 2011).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material Vegetal

Foram caracterizados 97 acessos de pinhão manso provenientes do Banco Ativo de Germoplasma (BAG) da Embrapa Meio-Norte, Piauí e Embrapa Algodão, Paraíba (Figura 1, Tabela 1). O estudo foi desenvolvido no Laboratório Biotecnologia e Biologia Molecular, na Embrapa Meio-Norte, em Teresina, PI.

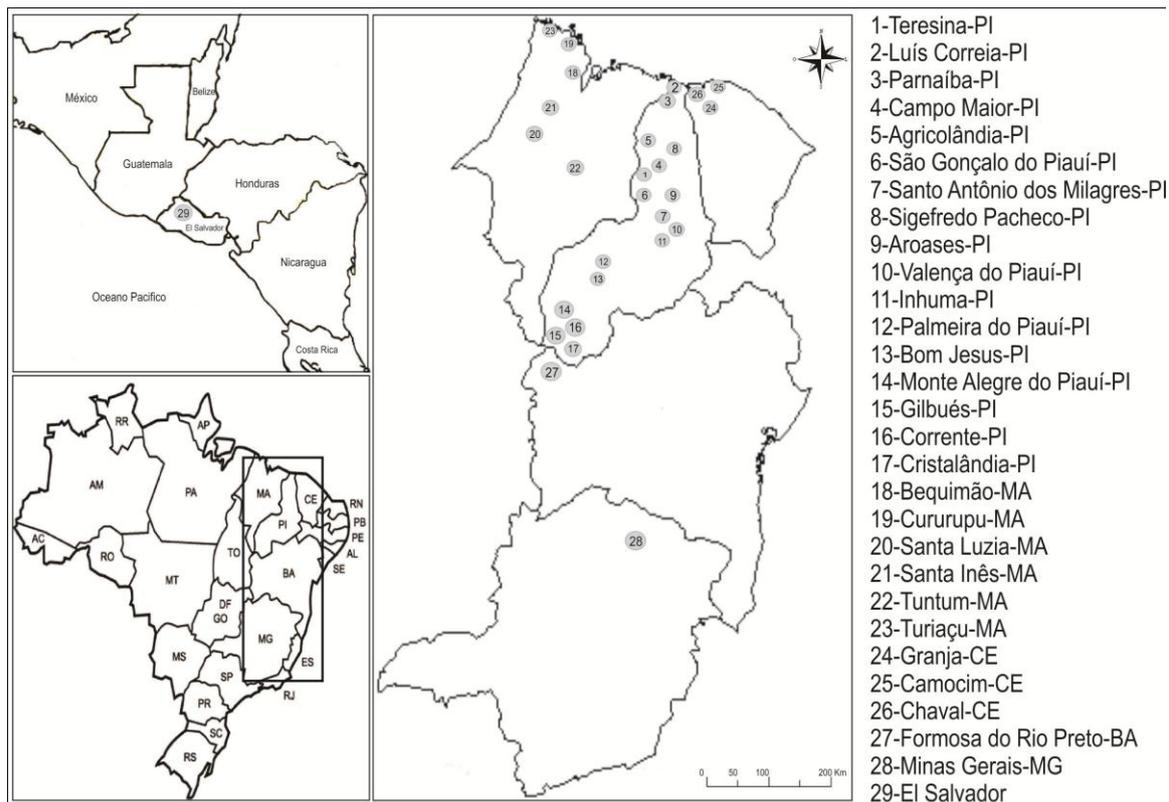


Figura 1 - Localização indicando os locais de procedência dos acessos, Teresina, PI, 2013

Tabela 1 - Acessos de pinhão manso, com a respectiva identificação e procedência, Teresina, PI, 2013

(Continuação)

Código dos acessos	Procedência	UF	Coordenadas geográfica
CMN26	Teresina	PI	-
CMN10/26	Teresina	PI	-
CMN27	Teresina	PI	-
CMN29	Teresina	PI	-
CMN31	Luís Correia	PI	03°03'12,8"S;41°18'56,6"W
CMN57	Luís Correia	PI	03°4'46,1"S;41°26'11,6"W
CMN58	Luís Correia	PI	03°05'21,9"S;42°27'06,9"W
CMN59	Parnaíba	PI	02°58'29,5"S;4°41'38,0"W
CMN60	Parnaíba	PI	03°04'37,1"S;41°46'22,4"W
CMN6/64	Campo Maior	PI	-
CMN12/66	Campo Maior	PI	04°51'43,1"S;42°2'0,9"W
CMN15/67	Campo Maior	PI	04°51'39,37"S;42°01'55,1"W
CMN8/80	Agricolândia	PI	05°47'8,4"S;42°38'28,05"W
CMN28/78	Agricolândia	PI	05°47'2,9"S;42°38'7,3"W
CMN3/98	São Gonçalo do Piauí	PI	05°59'19,7"S;42°42'40,1"W
CMN20/99	São Gonçalo do Piauí	PI	05°59'44,4"S;42°42'24,9"W
CMN101	Santo Antônio dos Milagres	PI	06°2'41,3"S;42°42'37,6"W
CMN102	Santo Antônio dos Milagres	PI	06°3'17,1"S;42°43'15,1"W
CMN103	Santo Antônio dos Milagres	PI	06°3'19,4"S;42°43'19,6"W
CMN11/104	Santo Antônio dos Milagres	PI	06°3'21,8"S;42°43'29"W
CMN178	Sigefredo Pacheco	PI	04°59'6,4"S;41°44'49,3"W

Tabela 1 - Acessos de pinhão manso, com a respectiva identificação e procedência, Teresina, PI, 2013

(Continuação)

Código dos acessos	Procedência	UF	Coordenadas geográfica
CMN208	Aroases	PI	06°10'48,6"S;41°49'16"W
CMN209	Aroases	PI	06°10'45,9"S;41°49'16"W
CMN212	Aroases	PI	06°6'46,3"S;41°47'47,1"W
CMN213	Aroases	PI	06°6'47,4"S;41°47'50,7"W
CMN214	Aroases	PI	06°6'44,4"S;41°47'50"W
CMN219	Valença do Piauí	PI	06°25'0,9"S;41°45'3,1"W
CMN221	Valença do Piauí	PI	06°24'55,4"S;41°44'29,7"W
CMN222	Valença do Piauí	PI	06°24'58,1"S;41°44'30,8"W
CMN225	Inhuma	PI	06°40'11,9"S;41°43'3,1"W
CMN231	Inhuma	PI	06°39'125,9"S;41°44'48,5"W
CMN234	Inhuma	PI	06°39'25,3"S;41°45'23"W
CMN259	Inhuma	PI	6°39'26,5"S;41°45'23"W
CMN308	Palmeira do Piauí	PI	08°42'35,5"S;44°15'12,9"W
CMN309	Palmeira do Piauí	PI	08°41'59,5"s;44°16'19,4"W
CMN312	Bom Jesus	PI	09°07'6,7"S;44°25'58,7"W
CMN313	Bom Jesus	PI	09°13'01"S;44°29'25,2"W
CMN317	Monte Alegre do Piauí	PI	09°33'16"S; 44°53'49,9"W
CMN318	Monte Alegre do Piauí	PI	09°33'44,8"S;44°57'55,8"W
CMN319	Monte Alegre do Piauí	PI	09°44'21,7"S;45°10'29,4"W
CMN321	Monte Alegre do Piauí	PI	09°45'20,3"S;45°18'4,8"W

Tabela 1 - Acessos de pinhão manso, com a respectiva identificação e procedência, Teresina, PI, 2013

(Continuação)

Código dos acessos	Procedência	UF	Coordenadas geográfica
CMN322	Gilbués	PI	09°49'21,7"S;45°24'45,3"W
CMN323	Gilbués	PI	09°49'38,6"S;45°25'7,6"W
CMN326	Corrente	PI	10°27'10"S;45°09'43,1"W
CMN327	Corrente	PI	10°26'8,6"S;45°09'36,1"W
CMN328	Cristalândia	PI	10°37'55,1"S;45°10'37,9"W
CMN330	Cristalândia	PI	10°43'10,6"S;45°11'14,4"W
CMN331	Cristalândia	PI	10°43'22,6"S;45°11'23,1"W
CMN1	Bequimão	MA	2°25'21,1"S;44°46'33,8"W
CMN2	Bequimão	MA	2°25'19,9"S;44°46'46,33"W
CMN3	Bequimão	MA	2°25'15,1"S;44°46'34,3"W
CMN4	Bequimão	MA	2°24,1'17"S;44°44'16"W
CMN5	Bequimão	MA	2°30' 20,9"S; 44°46'49,8"W
CMN7/7	Bequimão	MA	-
CMN8	Bequimão	MA	1°50'30,5"S; 44°46'46,9"W
CMN9	Cururupu	MA	01°50'30,5"S; 44°52'36,9"W
CMN10	Cururupu	MA	01°48' 7,7"S; 44°42'59"W
CMN11	Cururupu	MA	01°48' 9,8"S; 44°42' 52,2"W
CMN13	Cururupu	MA	01°40'14,7"S; 44°47'4,6"W
CMN17	Santa Luzia	MA	02°29'16,9"S;45°47'5,9"W
CMN18	Santa Luzia	MA	02°29'10,6"S;45°47'2,2"W
CMN14/18	Santa Luzia	MA	-

Tabela 1 - Acessos de pinhão manso, com a respectiva identificação e procedência, Teresina, PI, 2013

(Continuação)

Código dos acessos	Procedência	UF	Coordenadas geográfica
CMN19	Santa Inês	MA	3°39'23,9"S;45°22'35"W
CMN 21	Santa Inês	MA	03°39'19,7"S;45°26'35,7"W
CMN 22	Santa Inês	MA	03°41'33,8"S;45°24'15,8"W
CMN368	Tuntum	MA	05°24'4,9"S;44°49'58,5"W
CMN369	Tuntum	MA	05°22'53,2"S;44°47'15,2"W
CMN370	Tuntum	MA	05°16'07"S;44°37'56,3"W
CMN16	Turiaçu	MA	01°38'58,2"S;45°3'11,2"W
CMN2/16	Turiaçu	MA	-
CMN34	Granja	CE	03°7'28,1S; 40°49'30,8"W
CMN38	Granja	CE	03°10'38,8"S;41°06'40,1"W
CMN39	Granja	CE	03°16'10,9"S;41°08'01,0"W
CMN41	Granja	CE	03°10'23,3"S;41°12'23,8"W
CMN42	Granja	CE	03°13'43,1"S;41°12'36,2"W
CMN43	Granja	CE	03°16'3,5"S;40°59'20,4"W
CMN45	Camocim	CE	02°59'25,1S;40°54'47,7"W
CMN46	Camocim	CE	02°57'11,9"S;40°55'51,7"W
CMN47	Camocim	CE	02°56'1,7"S;40°55'42,5"W
CMN48	Camocim	CE	02°55'45,7"S;40°55'41,2"W
CMN49	Camocim	CE	2°55'11,8"S;40°53'11,7"W
CMN10/49	Camocim	CE	-
CMN50	Camocim	CE	02°53'37,6"S;40°55'13,3"W

Tabela 1 - Acessos de pinhão manso, com a respectiva identificação e procedência, Teresina, PI, 2013

(Conclusão)

Código dos acessos	Procedência	UF	Coordenadas geográfica
CMN51	Chaval	CE	03°02'51,1"S;41°14'18,4"W
CMN56	Chaval	CE	03°04'44,3"S;41°15'9,0"W
CMN332	Formosa do Rio Preto	BA	11°02'48,6"S;45°11'44,6"W
CMN333	Formosa do Rio Preto	BA	11°00'40,7"S;45°16'26,6"W
CMN334	Formosa do Rio Preto	BA	11°01'1,9"s;45°16'50,7"W
CMN336	Formosa do Rio Preto	BA	10°59'53"S;45°16'54,1"W
CMN J	Minas Gerais	MG	-
CMN NP	Minas Gerais	MG	-
CMN SS	Minas Gerais	MG	-
CNPA PM VII P3*	El Salvador	Mundo Novo-PB	07°35'31,3''S; 37°11'41,0" W
CNPA PM VII P4*	El Salvador	Mundo Novo-PB	07°35'31,3''S; 37°11'41,0" W

*Material obtido na Paraíba-PB por produtor

3.2 Extração e quantificação de DNA

As extrações de DNA genômico foram realizadas a partir de folhas jovens coletadas na fase ativa de crescimento das plantas. As amostras foram acondicionadas em sacos plásticos devidamente identificados e armazenados em isopor com gelo, sendo transportados até o Laboratório de Biotecnologia e Biologia Molecular da Embrapa Meio-Norte, onde foram mantidas em freezer até o início da extração que foi realizado conforme recomendações do Kit de purificação Invitex (INVISORB, 2008). A quantificação do DNA extraído foi verificada em gel de agarose a 0,8%, preparado em tampão TBE 0,5 × (Tris-Borato-EDTA), corado com GelRed-Biotium® 10.000 × (Uniscience) comparando a resolução do DNA das amostras com o DNA-λ diluído na concentração de 100 ng. A qualidade e quantidade de DNA extraído foi realizada no espectrofotômetro NanoDrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific). O DNA foi diluído à concentração de 7,0 ng/μL e estocado à -20°C.

3.3 Seleção de *primers* e reação ISSR

Foi avaliado um total de 100 *primers* desenvolvidos pela *University of British Columbia* (UBC), Vancouver, Canadá, em quatro acessos de pinhão manso com a finalidade de selecionar aqueles com maior polimorfismo, maior número e melhor resolução de bandas para serem utilizados na caracterização molecular dos acessos (Tabela 2).

Tabela 2 - *Primers* utilizados na caracterização molecular, temperatura de *melting* (T_m), temperatura de anelamento (T_a), sequência e percentual de GC, Teresina, PI, 2013

<i>Primers</i>	T _m (°C)	T _a (°C)	Sequência 5'-----3'	% GC
UBC 813	45,70	48,00	CTC TCT CTC TCT CTC TT	47,06
UBC 818	51,00	55,00	CAC ACA CAC ACA CAC AG	52,94
UBC 825	51,40	55,00	ACA CAC ACA CAC ACA	46,67
UBC 827	53,00	56,00	ACA CAC ACA CAC ACA CG	52,94
UBC 834	49,20	51,00	AGA GAG AGA GAG AGA GYT	50,00
UBC 844	48,60	50,00	CTC TCT CTC TCT CTC TRC	55,55
UBC 849	51,40	55,00	GTG TGT GTG TGT GTG TYA	50,00
UBC 855	53,10	57,00	ACA CAC ACA CAC ACA CYT	50,00
UBC 856	52,80	57,00	ACA CAC ACA CAC ACA CYA	50,00
UBC 885	48,30	52,00	BHB GAG AGA GAG AGA GA	58,82
UBC 889	50,10	52,00	DBD ACA CAC ACA CAC AC	58,82

*Y- (C,T); B- (C,G, T); D- (A, G, T); H- (A, G, T); V- (A, C, G).

As reações de amplificação via PCR, foram realizadas em termociclador Veriti 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems®), programado para 40 ciclos; com uma fase inicial de desnaturação a 94°C por 1 minuto e 30 segundos; seguida de 40 segundos a 94°C; temperatura de anelamento variando em função da temperatura de fusão do *primer*; 2 minutos a 72°C; finalizando com 5 minutos de extensão a 72°C.

Essas reações foram preparadas em volume final de 10 µL, contendo tampão 1,5 × [30 mM de Tris-HCl; 75 mM KCl] (Ludwig), 2,5 mM de MgCl₂ (Ludwig), 0,8 mM de dNTP, 0,25 µM de *primer*, 1U de *Taq* DNA Polimerase (Ludwig), 1 µL de DNA genômico (7 ng/µL) e H₂O ultrapura.

Os produtos das amplificações foram separados em gel de agarose a 1,5% em tampão TBE 0,5 × conduzido a 110 V por 6 horas e corado com GelRed-Biotium 10.000 × (Uniscience). Os tamanhos dos fragmentos amplificados foram comparados com o marcador DNA Ladder 1 Kb (Invitrogen), sendo visualizados em transiluminador UV e fotodocumentados.

3.4 Análises estatísticas

A análise do padrão de bandas gerada por cada *primer* possibilitou a montagem da matriz binária, em que foi conferido o valor 1 para a presença da banda e 0 para a ausência.

A partir desses dados, foi estimada a similaridade genética entre os acessos das diferentes populações, utilizando-se o coeficiente de similaridade de Jaccard (sg_{ij}), por meio da expressão 1 (ROHLF, 1992) calculado pelo programa PAST v. 1. 34 (HAMMER, HARPER, RYAN, 2001).

$$Sg_{ij} = \frac{a}{a + b + c} \quad (1)$$

em que:

a: presença de bandas nos indivíduos i e j ;

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

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

Em seguida, foi realizada a análise de agrupamento pelo método de Ligação Média entre Grupos (UPGMA). O coeficiente de correlação cofenético (r) foi calculado

pelo ajuste da matriz de similaridade e do dendrograma gerado. O índice de confiabilidade de *bootstrap* foi calculado a partir de 1.000 permutações.

O ponto de corte foi definido com base na estimativa da similaridade genética média (sg_m), obtida pela seguinte expressão 2:

$$sg_m = \frac{\sum sg_{ij}}{N} \quad (2)$$

em que:

sg_{ij} : similaridade genética entre cada par de indivíduos;

N: número de pares obtidos.

Para a análise intra e interpopulacional de pinhão manso foi utilizado o software POPGENE (*Population Genetic Analysis*) versão 1.32 (YEH; YANH; BOYLE, 2000), com parâmetros para dados diplóides dominantes. Foram obtidas as estatísticas descritivas número e percentual de locos polimórficos (P), a partir da expressão 3:

$$P = \frac{n^\circ \text{ de locos polimórficos}}{n^\circ \text{ total de locos}} \times 100 \quad (3)$$

A diversidade gênica de Nei (1973) (H_e) e o índice de Shannon (H_o), dado pela seguinte expressão 4:

$$H = - \sum p_i (\log_2 p_i) \quad (4)$$

em que:

p_i : é a proporção de indivíduos que possuem a banda em um determinado loco;

$\log_2 p_i$: é o logaritmo de p_i com base 2.

Nei (1973) propõe a partição da diversidade genética em seus componentes entre e dentro de populações, dado pela expressão 5:

$$H_T = H_S + D_{ST} \quad (5)$$

em que:

H_T = diversidade total, estimada a partir das frequências alélicas médias de cada loco;

H_S = componente da diversidade dentro da população;

D_{ST} = componente da diversidade entre populações, dentro da espécie considerada.

A proporção da diversidade genética que é atribuída ao componente entre populações é estimada pela expressão 6:

$$G_{ST} = \frac{D_{ST}}{H_T} \quad (6)$$

em que:

G_{ST} = diferenciação genética entre populações;

D_{ST} = componente da diversidade entre populações, dentro da espécie considerada;

H_T = diversidade total, estimada a partir das frequências alélicas médias de cada loco.

Ao final das análises, foi realizada a análise de variância molecular (AMOVA) usando-se o programa Arlequin versão 3.1 (EXCOFFIER, 2006). A análise foi realizada pela decomposição total dos seus componentes entre e dentro de populações (Tabela 3).

Tabela 3 - Análise de variância molecular (AMOVA)

Fonte de variação	Graus de liberdade	E (QM)
Entre populações	A - 1	$\sigma^2_b + n \sigma^2_a$
Dentro de populações	N - A	σ^2_b
Total	N - 1	σ^2_T

Fonte: Adaptado de Schneider; Roessli; Excoffier (2000)

em que:

A = Número de populações amostradas; N: número total de genótipos amostrados;

σ^2_b = componente de variância devido às diferenças entre municípios;

σ^2_a = componente de variância devido às diferenças entre amostras dentro de populações.

Os componentes de variância foram testados a partir do coeficiente, obtido pela seguinte expressão 7:

$$\Phi_{ST} = \frac{\sigma^2_a}{\sigma^2_T} \quad (7)$$

em que:

Φ_{ST} = corresponde à razão de variância entre populações pela variância total; representa o valor de indivíduos tomados ao acaso dentro de cada população, em relação a indivíduos tomados ao acaso em toda a amostra.

4 RESULTADOS

4.1 Análise da diversidade genética

Um conjunto de 11 *primers* selecionados gerou 307 locos ISSR, dos quais 294 foram polimórficos, correspondendo a 95,76% (Tabela 4), obtendo-se média de 27 locos por *primer*, cujo tamanho dos fragmentos variou de 300 a 5000 pb (Figura 2).

A menor e maior variação dos locos polimórficos foi encontrada nos *primers* UBC 889 e UBC 818 (Figura 3), com número de 7 e 51, respectivamente. Essa ampla variação demonstra alta variabilidade entre os acessos e o bom desempenho do marcador ISSR na avaliação da diversidade genética do pinhão manso. Os locos polimórficos que atingiram percentual de 93,55 a 100,00% foram os que obtiveram maior número de locos total, esse elevado número de locos aumentou a possibilidade da obtenção de maior polimorfismo.

Tabela 4 - Locos amplificados e locos polimórficos gerados por 11 *primers* ISSR, Teresina, PI, 2013

<i>Primers</i>	Total de Locos	Locos Polimórficos	Polimorfismo (%)	Tamanho dos fragmentos (pb)*
UBC 813	12	10	83,33	880-2000
UBC 818	51	51	100,00	450-3800
UBC 825	49	49	100,00	450-3500
UBC 827	41	41	100,00	450-5000
UBC 834	10	10	100,00	490-850
UBC 844	15	15	100,00	820-4000
UBC 849	31	29	93,55	850-3000
UBC 855	29	29	100,00	310-1680
UBC 856	43	43	100,00	1400-4000
UBC 885	14	10	71,42	300-1650
UBC 889	12	7	58,33	490-3000
Média	28	27	91,51	-

*pb: pares de bases

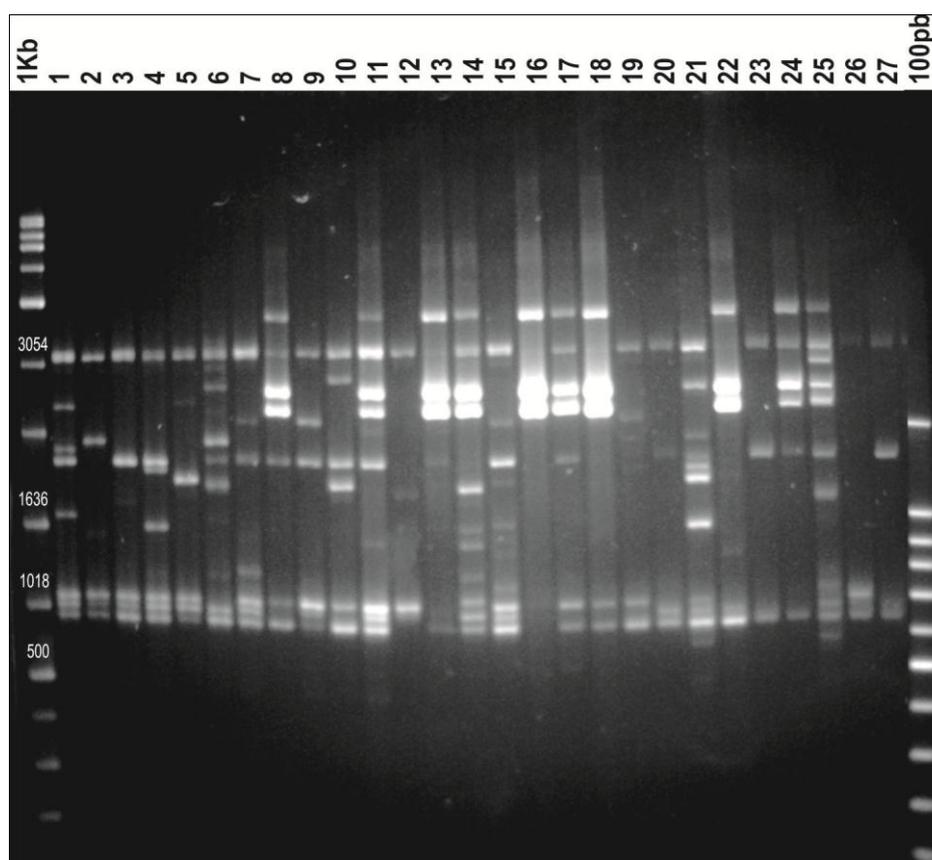


Figura 2 - Perfil de amplificação do *primer* UBC 818 em 27 acessos de pinhão manso. 1 a 25 - populações do Piauí; 26 e 27 - populações do El Salvador. Teresina, PI, 2013

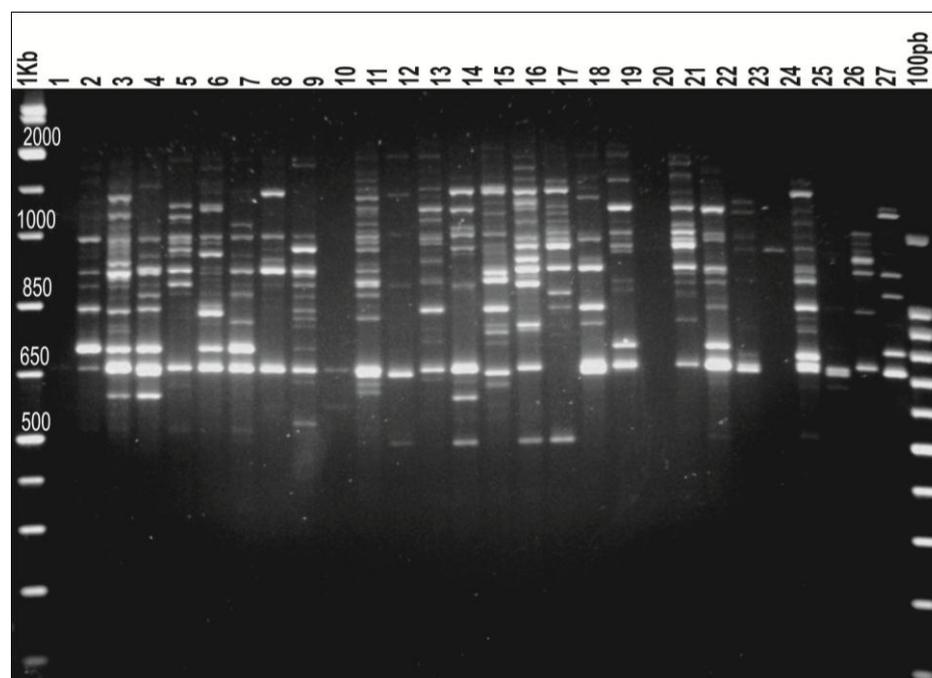


Figura 3 - Perfil do tamanho das bandas amplificadas a partir do *primer* UBC 856, Teresina, PI, 2013

A diversidade genética de Nei (1973) (He) e Shannon (Ho) variou entre as populações de Corrente-PI e Bequimão-MA de 0,0256 a 0,1703 (He) e 0,0374 a 0,1926 (Ho), respectivamente (Tabela 5). Para essas populações, os locos polimórficos (P%) variaram de 6,19 a 32,57% e o número de alelos observados (N_a) variou de 1,0619 a 1,325. Já o número efetivo de alelos (N_e) variou de 1,0438 (população de Corrente-PI) a 1,1496 (população de Santo Antônio dos Milagres-PI). Os locos assumiam estar em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Tabela 5 – Parâmetros genéticos estimados entre 29 populações de pinhão manso, Teresina, PI, 2013

(Continuação)

População	P%	N_a	N_e	He	Ho
Teresina-PI	19,22	1,1922	1,1310	0,0749	0,1101
Luís Correia-PI	18,89	1,1889	1,1219	0,0713	0,1060
Parnaíba-PI	11,07	1,1107	1,0783	0,0459	0,0670
Campo Maior-PI	21,82	1,2182	1,1327	0,0795	0,1193
Agricolândia-PI	16,94	1,1694	1,1198	0,0702	0,1024
São Gonçalo do Piauí-PI	9,12	1,0912	1,0645	0,0378	0,0552
Santo Antônio dos Milagres-PI	25,73	1,2573	1,1496	0,0890	0,1346
Sigefredo Pacheco-PI	21,82	1,2182	1,1242	0,0764	0,1160
El Salvador	7,49	1,0749	1,0530	0,0310	0,0453
Aroases-PI	19,22	1,1922	1,0853	0,0538	0,0849
Valença do Piauí-PI	13,36	1,1336	1,0725	0,0455	0,0697
Inhuma-PI	25,08	1,2508	1,1281	0,0799	0,1235
Palmeira do Piauí-PI	12,05	1,1205	1,0852	0,0499	0,0729
Bom Jesus-PI	7,49	1,0749	1,0530	0,0310	0,0453
Monte Alegre do Piauí-PI	14,98	1,1498	1,0783	0,0486	0,0748
Gilbués-PI	13,36	1,1336	1,0944	0,0553	0,0808
Corrente-PI	6,19	1,0619	1,0438	0,0256	0,0374
Cristalândia-PI	15,64	1,1564	1,0891	0,0548	0,0832
Bequimão-MA	32,57	1,3257	1,1422	0,1703	0,1926
Cururupu-MA	18,57	1,1857	1,0848	0,0548	0,0864
Santa Luzia-MA	18,24	1,1824	1,1054	0,0645	0,0976
Santa Inês-MA	15,64	1,1564	1,0994	0,0585	0,0872
Tuntum-MA	14,01	1,1401	1,0890	0,0524	0,0781
Turiaçu-MA	8,79	1,0879	1,0622	0,0364	0,0532

Tabela 5 - Parâmetros genéticos estimados entre 29 populações de pinhão manso, Teresina, PI, 2013
(Conclusão)

População	P%	<i>Na</i>	<i>Ne</i>	<i>He</i>	<i>H'</i>
Granja-CE	19,22	1,1922	1,0829	0,0528	0,0837
Camocim-CE	20,52	1,2052	1,0967	0,0606	0,0946
Chaval-CE	7,49	1,0749	1,0530	0,0310	0,0453
Formosa do Rio Preto-BA	22,48	1,2248	1,1273	0,0762	0,1157
Minas Gerais-MG	15,31	1,1531	1,0792	0,0508	0,0783

P% - Porcentagem de locos polimórficos, *Na* - Número de alelos observados, *Ne* - Número efetivo de alelos, *He* - Diversidade genética de Nei e *H'* - Índice de diversidade de Shannon

4.2 Análise de agrupamento

As similaridades genéticas entre os acessos de cada população de pinhão manso foram calculadas com base no coeficiente de Jaccard e agrupadas pelo método UPGMA, sendo representado graficamente pelo dendrograma (Figura 4). Nas 29 populações avaliadas os marcadores ISSR possibilitaram a discriminação de diferentes acessos sendo capaz de formar quatro grupos distintos. O dendrograma foi obtido a partir dos 307 locos amplificados, os valores de similaridade genética variaram de 0,132 a 0,915 e o ponto de corte foi definido pela média entre os locos, que foi de 0,35.

A maior similaridade foi observada entre os acessos de Teresina-PI (CMN 10/26 e CMN 26) com valor igual a 0,915, enquanto que a menor foi registrada entre os acessos de CMN 58 (Luís Correia-PI) e de CMN NP (Nova Porteirinha-MG) com 0,132, bem como as combinações entre CMN 16 (Turiaçu-MA) e CMN 7/7 (Bequimão-MA), CMN 333 (Formosa do Rio Preto-BA) e CMN 26 (Teresina-PI), CMN NP (Nova Porteirinha-MG) e CMN 12/66 (Campo Maior-PI) com 0,166; 0,170; 0,188, respectivamente. Destacando-se ainda, CMN 7/7 (Bequimão-MA) e CMN NP (Nova Porteirinha-MG) (0,133), CMN 333 (Formosa do Rio Preto-BA) e CMN 10/26 (Teresina-PI) (0,160), CMN 333 (Formosa do Rio Preto-BA) e CMN 58 (Luís Correia-PI) (0,161), CMN NP (Nova Porteirinha-MG) e CMN 10/26 (Teresina-PI) (0,168).

A importância desses resultados indica quais são os acessos mais divergentes dentro das populações, servindo de orientação na escolha dos parentais para futuro cruzamentos em programas de melhoramento genético.

O grupo I reuniu populações dos Estados da Bahia, Ceará, Maranhão e Minas Gerais (25 acessos/6 populações); o grupo II foi composto por acessos do Piauí e

Maranhão (23 acessos/6 populações); o grupo III, por acessos do Piauí, das mesorregiões Centro-Norte Piauiense e Sudoeste Piauiense (25 acessos/8 populações) e o grupo IV, por acessos do Piauí das mesorregiões Norte Piauiense, Centro-Norte Piauiense e uma população do El Salvador (25 acessos/9 populações).

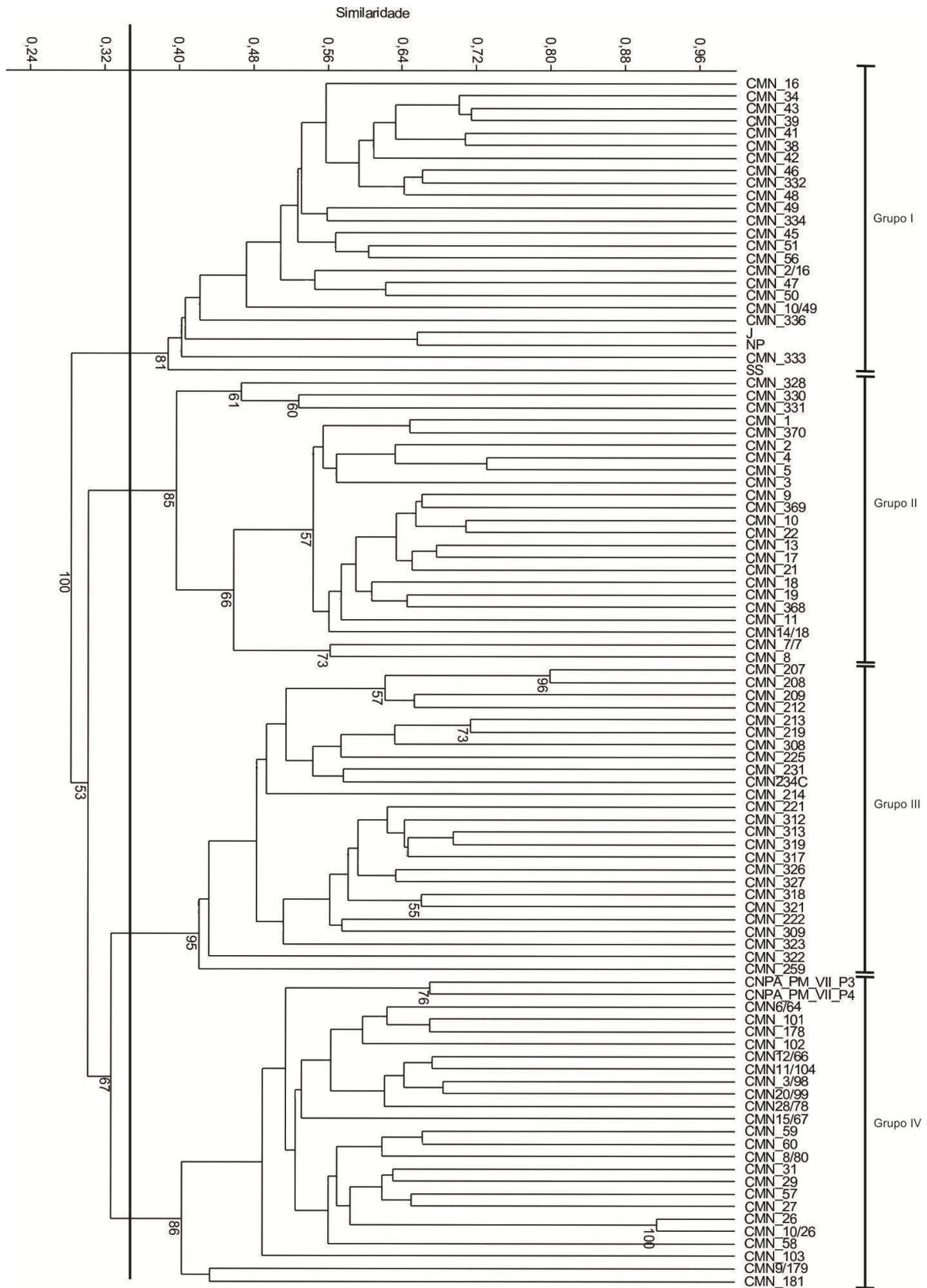


Figura 4 - Dendrograma de similaridade genética a partir do coeficiente de Jaccard com agrupamento pelo método UPGMA entre 97 acessos de *Jatropha curcas* L. pertencentes ao BAG da Embrapa Meio-Norte, Piauí e Embrapa Algodão, Paraíba

4.3 Estrutura genética

O valor do coeficiente de diferenciação genética (G_{ST}) entre as populações foi de 0,6306. Na AMOVA ($\Phi_{ST} = 0,4452$, $P < 0,001$) e no Φ_{ST} pairwise também foi verificado que houve diferenciação genética entre as 29 populações de pinhão manso, sendo a diversidade genética total dividida em 44,52% entre as populações e 55,48% dentro das populações (Tabela 6). O valor Φ_{ST} pairwise revelou a menor distância entre as populações de Campo Maior-PI e Agricolândia-PI (-0,132), enquanto que o maior registro foi entre Parnaíba-PI e Chaval-CE (0,679).

Tabela 6 - Análise de variância molecular (AMOVA) em 29 populações de pinhão manso. Teresina, PI, 2013

Fonte de variação	GL	SQ	Componentes de variância	Varição (%)	Φ_{ST}	P*
Entre populações	28	1671,647	13,16	44,52	0,4452	0,001
Dentro das populações	67	1098,988	16,40	55,48	-	-
Total	95	2770,635	29,56582	100,00	-	-

*Testes significantes depois de 1000 permutações; GL: grau de liberdade; SQ: soma dos quadrados; Φ_{ST} : índice de fixação

5 DISCUSSÃO

A caracterização da variabilidade genética de uma espécie é essencial para o sucesso de um programa de melhoramento genético. No pinhão manso, a carência de conhecimento sobre a variabilidade genética tem limitado o seu cultivo, o que dificulta também o avanço em programas de melhoramento (GRATIVOL et al., 2011).

Neste estudo, o uso de cuba horizontal com plataforma de 0,20 x 0,25 m, de pentes com maior largura e de corante com maior capacidade de interação com a molécula de DNA, permitiram maior tempo de corrida, melhor separação e visualização das bandas o que facilitou a verificação do alto polimorfismo. Os tamanho dos fragmentos variaram de 300 a 5000pb, Basha et al. (2009) e Sunil et al. (2008) registraram 100 a 3500 pb e 250 a 3000 pb, respectivamente, em pinhão manso e com ISSR.

Conforme Grativol et al. (2011), a eficiência de um marcador molecular pode ser medida pela quantidade de polimorfismo que o mesmo é capaz de detectar. Tal eficiência foi evidenciada por Kumar, Parthiban e Rao (2008), em estudo de diversidade genética entre espécies do gênero *Jatropha*, no qual oito *primers* ISSR obtiveram 100% de bandas polimórficas, registrando polimorfismo de 98,14% e também por He et al. (2007) que avaliaram na China, a diversidade e estruturação genética em nove populações naturais de pinhão manso com base em 10 *primers* ISSR, obtendo polimorfismo total de 97,04%.

Embora o pinhão manso seja uma espécie alógama, há vários registros de baixa variabilidade presente entre os acessos. Basha e Sujatha (2007) obtiveram variabilidade de 33,5% (ISSR) e 42% (RAPD), Shen et al. (2010) e Chen et al. (2011) obtiveram 26,99% (RAPD) e 34,0% (RAPD, ISSR), respectivamente. Esses valores foram associados com a intensa circulação de materiais por meio de propagação vegetativa, o que aumenta a chance de conter materiais de mesma procedência nos bancos de germoplasma. Além do modo de propagação da espécie, pode-se atribuir a baixa diversidade ao tipo de sistema reprodutivo, pela ocorrência de apomixia. Na Índia, já foi registrado taxa de apomixia de 32% (BHATTACHARYA; KALYANI; SUBODH, 2005).

Contudo no Brasil, Juhász et al. (2009) avaliaram a formação de frutos por diferentes tipos de reprodução, tais como: apomixia (5%), autofecundação natural (20%), geitonogamia (79%) e xenogamia com pólen de uma planta (80%), xenogamia com mistura de pólen (88%), observando predominância de frutos formados por xenogamia, ou seja, por fecundação cruzada. Outro estudo também no Brasil observaram taxas de 80% e 95% para a formação de frutos por xenogamia nas espécies *J. mutabilis* e *J. mollissima*, respectivamente (SANTOS, MACHADO, LOPES, 2005).

Apesar de não se conhecer a biologia reprodutiva dos acessos analisados, acredita-se que há predominância de fecundação cruzada, favorecendo a presença de variabilidade nas populações estudadas. Por outro lado, a falta de sincronismo na abertura das flores masculinas e femininas no pinhão manso, proporciona a fecundação cruzada ou xenogamia (HELLER, 1996; CHANG-WEI et al., 2007).

De modo geral, o conhecimento do sistema reprodutivo de uma espécie é fundamental para o melhoramento de plantas, além disso, informações sobre endogamia

e sistema reprodutivo predominante são muito usados para estabelecer estratégias de conservação da variabilidade genética, bem como manejo sustentável (BUENO; MENDES; CARVALHO, 2006).

Com relação à origem do pinhão manso, até o momento não foi claramente estabelecido, Basha e Sujatha (2007) declararam ser o México e a América Central. Apesar das restritas citações apontando o Brasil, porém baseados no alto polimorfismo detectado neste estudo, bem como no de Grativol et al. (2011), o país demonstra ser região de diversidade, sendo para isso necessário mais constatações experimentais, sobretudo com materiais de outras regiões do país.

A estimativa de locos polimórficos, provenientes de diferentes marcas moleculares (locos) tem sido muito usada para quantificar a variação da diversidade. Os valores médios entre as populações avaliadas nesse estudo variaram de 6,19 (Corrente-PI) a 32,57% (Bequimão-MA), isso demonstra que os acessos possuem origem distinta e que as populações estudadas podem ser consideradas como fonte de diversidade.

Gupta et al. (2008) verificaram também no pinhão manso valores de $N_a = 0,426 - 1,765$; $N_e = 0,355 - 1,407$ em estudo de diversidade baseado em marcador ISSR e RAPD. Ovando-Medina et al. (2011) a partir do marcador AFLP obtiveram $N_a = 1,434 - 1,842$; $N_e = 1,181 - 1,398$ em cinco populações do México (134 acessos).

A menor e maior diversidade genética foi encontrada a partir dos Índices de Nei (H_e) e Shannon (H_o) nas populações de Corrente-PI $H_e = 0,0256$ e $H_o = 0,0374$ e Bequimão-MA $H_e = 0,1703$ e $H_o = 0,1926$, respectivamente, indicando que na segunda população existe variação genética, sendo por isso uma opção de escolha de parentais em programas de hibridização. Para estes mesmo índices Grativol et al. (2011) registraram variação de diversidade de $H_e = 0,0498$ e $H_o = 0,0782$ a $H_e = 0,1699$ e $H_o = 0,2450$.

A matriz de similaridade demonstrou a existência de variabilidade entre os acessos, com correlação cofenética (r) igual a 0,91, o que indica boa consistência dos dados, garantindo maior confiabilidade sobre as inferências geradas a partir do dendrograma, pois conforme SOKAL e ROHLF (1962) valores de correlação cofenética superiores a 0,80 indicam um bom ajuste entre as matrizes originais de distância e a análise de agrupamento resultante.

Desta forma, as combinações entre os acessos podem ser indicados como parentais em cruzamentos e também possibilitar a ampliação da base genética, adicionalmente, essa análise contribui no direcionamento de estudos em conservação devido à existência de variabilidade genética.

A amplitude de variação dos coeficientes de similaridade foi alta nos quatro grupos, com destaque para os grupos I e IV que obtiveram variação do coeficiente de similaridade de 0,1319 (CMN NP e CMN 58) a 0,7143 (CMN 39 e CMN 43) e 0,264 (CMN 181 e CMN 10/26) a 0,916 (CMN 10/26 e CMN 10), respectivamente. No grupo I, essa variação está associada ao maior número de populações oriundas de Estados diferentes, enquanto que no grupo IV, as populações da mesorregião Norte Piauiense e Centro-Norte Piauiense foram agrupados com a população do El Salvador. Isso reforça a existência de variabilidade nas populações do Piauí, pois se mantiveram no mesmo grupo dos acessos provenientes da provável região de origem do pinhão manso.

No grupo II, a população de Cristalândia-PI agrupou-se com as populações do Maranhão, sendo a única evidencia neste estudo de troca de material entre os Estados do Piauí e Maranhão. Indicando também diferenciação genética da população de Cristalândia-PI com as outras populações do Estado do Piauí. Neste grupo a amplitude de variação do coeficiente de similaridade foi de 0,158 (CMN 7/7 e CMN 208) a 0,731 (CMN 5 e CMN 4). O grupo III concentrou populações de duas mesorregiões do Piauí, isso confirma a existência de diferenciação genética. Ainda no grupo III, foi verificado que dentro de uma mesma mesorregião houve populações agrupadas separadamente, a amplitude de variação também foi alta de 0,224 (CMN 234 e CMN 10/26) a 0,800 (CMN 208 e CMN 207).

É interessante observar que os acessos do Estado do Piauí ficaram separados em diferentes grupos, o que evidencia variação genética em diferentes pontos dentro do Estado; outra questão é que os acessos oriundos da região mesoamericana (centro de diversidade da espécie) ficaram no grupo IV.

O coeficiente da diferenciação genética ($G_{ST} = 0,6306$) indicou que ocorreu uma diferenciação genética entre as populações. Enquanto que a distribuição da variabilidade genética entre e dentro as populações, baseado na AMOVA, indicou maior variabilidade dentro das populações. Sirithunya e Ukoskit (2010), em estudo de estruturação genética (ISSR) com pinhão manso, também encontraram maior diferenciação dentro das

populações (83,31%). Esses estudos demonstraram eficiência no uso dos marcadores adotados. Ovando-Medina et al. (2011) também relataram maior variabilidade dentro das populações (87,8%) ao usar marcador AFLP.

De acordo com Galetti et al. (2008), as espécies tipicamente alógamas apresentam maior variabilidade genética dentro das populações, porém a divergência das populações podem ser reduzida com o aumento do fluxo gênico. As espécies perenes, de ciclo longo e com ampla distribuição geográfica, normalmente possuem maior variabilidade genética dentro da população (HAMRICK; GODT, 1990).

A análise estatística dos valores do Φ_{ST} *pairwise* mostrou-se significativa, o que evidencia a diferença genética existente nas populações estudadas. Neste estudo, o uso dos marcadores ISSR foi bastante eficiente na busca pela melhor compreensão da diversidade e estruturação genética das populações de pinhão manso pertencente aos BAG da Embrapa Meio-Norte, Piauí e Embrapa Algodão, Paraíba, sendo capaz de detectar a existência de variabilidade entre os acessos analisados.

6 CONCLUSÕES

O Banco Ativo de Germoplasma de Pinhão Manso da Embrapa Meio-Norte apresenta variabilidade genética;

Os Estados do Piauí, Maranhão, Ceará, Bahia e Minas Gerais, possuem populações com variabilidade genética em pinhão manso;

No Estado do Piauí há concentração de variabilidade genética nas mesorregiões Norte Piauiense, Centro-Norte Piauiense e Sudoeste Piauiense;

As populações de Campo Maior-PI e Agricolândia-PI são as mais divergentes e Parnaíba-PI e Chaval-CE as mais similares;

A maior variabilidade genética da espécie está presente dentro das populações;

Os cruzamentos entre os acessos CMN 58 e CMN NP; CMN 7/7 e CMN NP; CMN 333 e CMN 10/26; CMN 333 e CMN 58; CMN 16 e CMN 7/7; CMN NP e CMN 10/26; CMN 333 e CMN 26 constituem a melhor combinação para programas de melhoramento.

REFERÊNCIAS

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 semiárido nordestino. **Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibrosas**, v. 8, p. 789–799, 2004.

ASSEFA, K.; MERKER, A.; TEFERA, H. *Inter simple sequence (ISSR) analysis of genetic diversity in tef [Eragrostis tef (Zucc.) Trotter]*. **Hereditas**, v. 3, p. 174–173, 2003.

BARTH, S.; MELCHINGER, A. E.; LUBBERSTEDT, T. L. Genetic diversity in *Arabidopsis thaliana* L. Heynh. investigated by cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS) and inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. **Molecular Ecology**. v. 11, p. 495–505, 2002.

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**, 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**, v. 156, p. 375–386, 2007.

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).

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

BLAIR, M. W.; PANAUD, O.; MCCOUCH, S. R. Inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification for analysis of microsatellite motif frequency and fingerprinting in rice (*Oryza sativa* L). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 98, p. 780–792, 1999.

BORÉM, A. **Melhoramento de Plantas**. 3ªed. Viçosa: UFV, 2001, 500p.

BORÉM, A.; CAIXETA, E. T. **Marcadores Moleculares**. 2. ed. Viçosa: UFV, 532 p. 2009.

BORNET, B.; BRANCHARD, M. Nonanchored inter simple sequence repeat (ISSR) markers: reproducible and specific tools for genome fingerprinting. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 19, p. 209–215, 2001.

BUENO, L. C. S.; MENDES, A. N. G.; CARVALHO, S. P. (Ed.). **Melhoramento Genético de plantas. Princípios e procedimentos**. 2ª ed. Lavras: UFLA, 2006. 282 p.

BRASIL.Ministério da Indústria e do Comércio. Secretária de Tecnologia Industrial. **Produção de combustíveis líquidos a partir de óleos vegetais**. Brasília: STI/CIT, 1985. 364p. (Documentos, 16).

CAI, Y.; SUN, D.; WU, G.; PENG, J. ISSR-based genetic diversity of *Jatropha curcas* germplasm in China. **Biomass and Bioenerg**. v. 7, p.1–12, 2010.

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

CARVALHO, R. C.; CLARINDO, W. R.; PRAÇA, M. M.; ARAÚJO, F. S.; CARELS, N. Genome size, base composition and karyotype of *Jatropha curcas* L. an important biofuel plant. **Plant Science**, v. 174, p. 613–617, 2008.

CHANG, Y. Z. D.; GERPEN, V. H. J.; LEE, I.; JOHNSON, A. L.; HAMMOND, G. E.; MARLEY, J. S. Fuel properties and emissions of soybean oil esters as diesel fuel; **Journal of American Oil Chemical Society**, v. 73, p. 1549, 1996.

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

- CHEN, K.; REN, P.; YING, C.; JIANG, Q.; JIA, X., Genetic relationships among *Jatropha curcas* L. clones from Panzhuhua, China as revealed by RAPD and ISSR. **African Journal of Agricultural Research**, v. 6, p. 2582–2585, 2011.
- CHRISTOPOULOS, M. V.; ROUSKAS, D.; TSANTILI, E.; BEBELIC, P. J. Germplasm diversity and genetic relationships among walnut (*Juglans regia* L.) cultivars and Greek local selections revealed by Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) markers. **Scientia Horticulturae**, v. 125, p. 584–592, 2010.
- CULLEY, T. M, WOLFE, A. D. Population genetic structure of the cleistogamous plant species *Viola pubescens*, as indicated by isozyme and ISSR molecular markers. **Heredity**, v. 86, p. 545–556, 2001.
- DRUMMOND, O. A.; PURCINO, A. A. C.; CUNHA, L. H. S.; VELOSO, J. M. **Cultura do pinhão manso**. Belo Horizonte: Epamig, 1984. 99p.
- EXCOFFIER, L. Arlequin: **Computational and Molecular Population Genetics Lab CPMG**. Version 3.01. Zoological Institute, University of Berne, Switzerland, 2006.
- FAIRLESS, D. Biofuel: the little shrub that could-maybe. **Nature**, v. 449, p. 652–655, 2007.
- FREITAS, R. G.; MISSIO, R. F.; MATOS, F. S.; RESENDE, M. D. V.; DIAS, L. A. S. Genetic evaluation of *Jatropha curcas*: an important oilseed for biodiesel production. **Genetics and Molecular Research**, v. 10, p. 1490–1498, 2011.
- GALETTI, J. R.; RODRIGUES, P. M.; SOLÉ-CAVA, F. P. et al Genética da conservação brasileira. In: **Fundamentos de Genética da Conservação**. FRANKHAM, R., BALLOU, J. D., BRISCOE, D. A., Ribeirão Preto, Editora SBG, 2008, v. 1, p. 199–229.
- GOMES, S. O.; MENDES, R. F. M. ; LIMA, P. S da C . Repetibilidade de marcadores ISSR em acessos de pinhão manso. In: CONGRESSO DA REDE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE BIODIESEL, 5.; CONGRESSO BRASILEIRO DE PLANTAS OLEAGINOSAS, ÓLEOS, GORDURAS E BIODIESEL. 8., 2012, Salvador. **Anais...**Salvador: Inovação e Desenvolvimento Regional, 2012. v. 1. p. 357-358.

GONZÁLEZ, A.; COULSON, M.; BRETTELL, R. Development of DNA markers (ISSRs) in mango. **Acta Horticulturae**, v. 575, p. 139–143, 2002.

GOULÃO, L.; OLIVEIRA, C.; M. Molecular characterisation of cultivars of apple (*Malus x domestica* Borkh.) using microsatellite (SSR and ISSR) markers. **Euphytica**, v. 122, p. 81–89, 2001.

GRATIVOL, C.; MEDEIROS. C. F. L.; HEMERLY, A. S.; FERREIRA, P. C. G. High efficiency and reliability of inter-simple sequence repeats (ISSR) markers for evaluation of genetic diversity in Brazilian cultivated *Jatropha curcas* L. accessions. **Molecular Biology Reporter**, v. 38, p. 4245–4256, 2011.

GUPTA, M.; CHYI, Y.; S.; ROMERO-VERSON, J.; OWEN, J.; L. Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single *primers* of simple-sequence repeats. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 89, p. 998–1006, 1994.

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**, v. 7, p. 4230–4243, 2008.

HAMMER, O.; HARPER, D. A. T.; RYAN, P. D. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. **Palaeontologia Electronica**, v. 4, 2001. 9p.

HAMRICK, J. L.; GODT, M. J. W. Allozyme diversity in plant species. In: BROWN, A.H.D.; CLEGG, M.T.; KAHLER, A.L.; WEIR, B.S. (Ed.). **Plant population genetics, breeding, and genetic resources**, p.43–63, 1990.

HE, W.; GUO, L.; WANG, L.; YANG, W.; TANG, L.; CHEN, F. ISSR analysis of genetic diversity of *Jatropha curcas* L. Chinese **Journal Application Environmental Biology**, v. 13, p. 466–470, 2007.

HELLER, J. Physic nut (*Jatropha curcas* L.). **Promiting the conservation and use of underutilized and neglected crops** 1. IBPGR 161. Roma, IBPGR, 1996. 66p.

INVISORB. **Spin Plant Mini Kit for DNA extractions**, *Invitex*, 2008.

JOSHI, S. P.; GUPTA, V. S.; AGGARWAL, R. K.; RANJEKAR, P. K.; BRAR, D. S. Genetic diversity and phylogenetic relationship as revealed by inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism in the genus *Oryza*. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 100, p. 1311–1320, 2000.

JUHÁSZ, A. C. P.; PIMENTA, S.; SOARES, B. O.; MORAIS, D. L. B.; RABELLO, H. O. Biologia floral e polinização artificial de pinhão manso no norte de Minas Gerais, **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, p. 1073–1077, 2009.

KARP, A.; ADWARDS, K. DNA markers: a global overview: In: ANOLLES, G. C.; GRESSHOFF, P. M. (Ed.). **Dna markers: protocols, applications and overviews**. New York: Willy-Liss, p. 1–14, 1998.

KUMAR, A.; SHARMA, S. An evaluation of multipurpose oil seed crop for industrial uses (*Jatropha curcas* L.): a review. **Industrial Crops Products**, v. 28, p. 1–10, 2008.

KUMAR, R. S.; PARTHIBAN, K. T.; RAO, M. G. Molecular characterization of *Jatropha* genetic resources through inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. **Molecular Biology Reporter**, v. 36, p. 1951–1956, 2008.

LAPOLA, D. M.; PRIESS, J. A.; BONDEAU, A. Modeling the land requirements and potential productivity of sugarcane and *Jatropha* in Brazil and India using the LPJmL dynamic global vegetation model. **Biomass and Bioenergy**, v. 33, p. 1087–1095, 2009.

LAVIOLA, B. G.; BHERING, L. L.; ALBRECHT, J. C.; MARQUES, S. S.; ROSADO, T. B. Caracterização morfo-agronômica do banco de germoplasma de pinhão manso. In: Congresso Bras. Pl. oleaginosas, óleos, gorduras e biodiesel, 6., 2009, Montes Claros. **Anais...** Lavras: UFLA, 2009. v. 6.

LAVIOLA, B. G.; BHERING, L. L.; ALBRECHT, J. C.; ROSADO, L. T. B.; MARQUES, S. S.; MARANA, J. C.; RIBEIRO, J. A. A. **Caracterização do banco de germoplasma de pinhão manso: resultados do 1º ano de avaliação**. Brasília-DF: Embrapa Agroenergia, 2010. 8f. (Embrapa Agroenergia. Comunicado técnico, 3).

MASJUK, H; SAPUAN, M. S. Palm Oil Methyl Esters as Lubricant Additive in a Small Diesel Engine. **Journal of American Oil Chemical Society**, v. 12, p. 609–612, 1995.

MELCHINGER, A. E.; GRANER, A.; SINGH, M.; MESSMER, M. M. Relationships among european barley germplasms: I. Genetic diversity among winter and spring cultivars revealed by RFLPs. **Crop Science**, v. 34, p. 1191–1199, 1994.

MENDES, R. F. M.; GOMES, S. O.; LIMA, P. S da C . Reprodutibilidade de marcadores ISSR em pinhão manso. In: CONGRESSO DA REDE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE BIODIESEL, 5.; CONGRESSO BRASILEIRO DE PLANTAS OLEAGINOSAS, ÓLEOS, GORDURAS E BIODIESEL, 8., 2012, Salvador. **Anais...**Salvador: Inovação e Desenvolvimento Regional, 2012. v. 1. p. 365–366.

MENDONÇA, S.; LAVIOLA, B. G. **Uso potencial e toxidez da torta de pinhão manso**. Brasília, DF: Embrapa Agroenergia, 2009. 8 p. (Embrapa Agroenergia. Comunicado técnico, 001).

MÜHLEN, G. S.; MARTINS, P. S.; ANDO, A. Variabilidade genética de etnovariedades de mandioca, avaliada por marcadores moleculares de DNA. **Scientia Agricola**, v.57, p.319–328, 2000.

NEI, M. **Analysis of gene diversity in subdivided populations**. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America v. 70, p. 3321–3323. 1973.

OPENSHAW, K. A review of *Jatropha curcas* L.: an oil plant of unfulfilled promise. **Biomass and Bioenergy**, v. 19, p. 1–15, 2000.

OVANDO-MEDINA, I.; SÁINCHÉZ-GUTIÁRREZ, A.; ADRIANO-ANAYA, L.; ESPINOSA-GARCÍA, F.; NÁEZ-FARFÁIN, J.; SALVADOR-FIGUEROA, M. Genetic Diversity in *Jatropha curcas* L. Populations in the State of Chiapas, Mexico. **Diversity**, v. 3, p. 641–659, 2011.

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

- PAMIDIMARRI, D. V. N. S.; MASTAN, S. G.; RAHMAN, H.; REDDY, M. P. Molecular characterization and genetic diversity analysis of *Jatropha curcas* L. in India using RAPD and AFLP analysis. **Molecular Biology Report**, v. 37, p. 2249–2257, 2010.
- PEIXOTO, A. R. **Plantas oleaginosas arbóreas**. São Paulo: Nobel, 1973. 284p.
- REDDY, M. P.; SARLA, N.; SIDDIQ E. A. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. **Euphytica**, v. 128, p. 9–17, 2002.
- ROHLF, F. J. **Numerical taxonomy and multivariate analysis system**. New York, 1992. 470 p.
- 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 manso por marcadores moleculares**. Brasília: Embrapa Agroenergia, 2009. 16p. (Embrapa Agroenergia, Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 1).
- ROSSI, A. A. B.; OLIVEIRA, L. O.; VENTURINI, B. A.; SILVA, R. S. Genetic diversity and geographic differentiation of disjunct Atlantic and Amazonian populations of *Psychotria ipecacuanha* (Rubiaceae). **Genética**, v. 136, p. 57–67, 2009.
- SANTOS, M. J.; MACHADO, I. C.; LOPES, A. V. Biologia reprodutiva de duas espécies de *Jatropha* L. (Euphorbiaceae) em caatinga, Nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 28, p. 361–373, 2005.
- SATURNINO, H. M.; PACHECO, D. D.; KAKIDA, J.; TOMINAGA, N.; GONÇALVES, N. P. Cultura do pinhão manso (*Jatropha curcas* L.). **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 26, n. 229, p. 44–78, 2005.
- SCHNEIDER, S.; ROESSLI, D.; EXCOFFIER, L. **Arlequin versão 2. 000**: a software for population genetics data analysis. Switzerland: Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, 2000.

SHEN, J. L.; JIA, X. N.; NI, H. Q.; SUN, P. G.; NIU, S. H.; CHEN, X. Y. AFLP analysis of genetic diversity of *Jatropha curcas* L. grown in Hainan, China. **Trees**, v. 24, p. 455–462, 2010.

SILVA, K. V. P. da; CUNHA, A. A. da; MARTINS, M. I. G.; MELO, C. A. F. de; CARVALHO, R. de; Variabilidade genética entre acessos do gênero *Manihot* por meio de marcadores moleculares ISSR. **Pesquisa agropecuária brasileira**. [online]., v. 46, p. 1082–1088, 2011.

SILVA, S. G. A.; SILVA, F. K. G. da; DINIZ, A. L.; ARRIEL, N. H. C., Caracterização da diversidade de acessos de pinhão manso. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA, 3., 2008, Salvador. **Anais...** Salvador: Energia e Ricinoquímica, 2008. 1 CD-ROM.

SIRITHUNYA, P.; UKOSKIT, K. Population Genetic Structure and Genetic Diversity of *Jatropha curcas* L. Germplasm as Investigated by 5'-anchored Simple Sequence Repeat *Primers*. **Journal of Crop Science and Biotechnology**, v. 13, p. 147–153, 2010.

SLUSZZ, T.; MACHADO, J. A. D. Características das potenciais culturas matérias-primas do biodiesel e sua adoção pela agricultura familiar. In: ENCONTRO DE ENERGIA NO MEIO RURAL, 6., 2006, Campinas. **Anais eletrônicos**. Disponível em: <http://www.proceedings.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=MSC0000000022006000100032&lng=pt&nrm=abn>. Acesso em: 04 Dez. 2012.

SOLOMON RAJU, A. J.; EZRADANAM, V. Pollination ecology and fruiting behaviour in a monoecious species, *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae). **Current Science**, v. 11, p. 1395–1398, 2002.

SOKAL, R. R.; ROHLF, F. J. The comparison of dendrograms by objective methods. **Taxon**, Berlin, v.11, p.30–40, 1962.

SUN, Q.; LI, L.; LI, Y.; WU, G.; GE, X. SSR and AFLP Markers Reveal Low Genetic Diversity in the Biofuel Plant *Jatropha curcas* in China. **Crop Science**, 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 and Bioenergy**, v. 32, p. 198–202, 2008.
- TANYA, P.; TAEPRAYOON, P.; HADKAM, Y.; SRINIVES, P. Genetic diversity among *Jatropha* and *Jatropha* related species based on ISSR markers. **Plant Molecular Biology Reports**, v. 29, p. 252–264, 2011.
- TEIXEIRA, L. C. Potencialidades de oleaginosas para produção de biodiesel. **Informe Agropecuário**, v. 26, n. 229, p. 18–27, 2005.
- VASCONCELOS, G. C. L.; ARRIEL, N. E. C.; MEDEIROS, K. A. A. L.; MEDEIROS, O. S.; MELO, J. I. M.; LUCENA, A. M. A.; FREIRE, M. A. L. Caracterização botânica de acessos de pinhão manso do banco de germoplasma da Embrapa Algodão. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA, 4.; SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE OLEAGINOSAS ENERGÉTICAS, 1., 2010, João Pessoa. **Anais...**Campina Grande: Inclusão social e energia, 2010. 1 CD-ROM.
- 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**, p.121–128, 2005.
- VIJAYANAND, V.; SENTHIL, N.; VELLAIKUMAR, S.; PARAMATHMA, M. Genetic Diversity of Indian *Jatropha* Species as Revealed by Morphological and ISSR Markers. **Journal of Crop Science and Biotechnology**, v. 12, p. 115–120, 2009.
- WEBSTER, G. L. Classification of the Euphorbiaceae. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 81, p. 3–32, 1994.
- WOLFE, A. D.; LISTON, A. Contributions of PCR- based methods to plant systematics and evolutionary biology. In: SOLTIS, D.E.; SOLTIS, P.S.; DOYLE, J.J. (Ed.). **Molecular systematics of plants II: DNA SEQUENCING**. BOSTON: KLUWER ACADEMIC, p. 43–86, 1998.

YEEH, Y.; KANG, S. S.; CHUNG, M. G. Evaluations of the natural monument populations of *Camellia japonica* (*Theaceae*) in Korea based on allozyme studies. **Botanical Bulletin of Academia**, v. 37, p. 141–146, 1996.

YEH, F; YANH, R.; BOYLE, T. **Microsoft windows-based freeware for population genetic analysis, Popgene version 1.31**. 2000.

ZIETKIEWICZ, E.; RAFALSKI, A.; LABUDA, D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) anchored polymerase chain reaction amplification. **Genomics**, v. 20, p. 176–183, 1994.