

Avaliação da Diversidade Genética do Banco de Germoplasma de Pinhão-manso por Marcadores Moleculares



**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Agroenergia
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 01

Avaliação da Diversidade Genética do Banco de Germoplasma de Pinhão-manso por Marcadores Moleculares

*Tatiana Barbosa Rosado
Bruno Galvêas Laviola
Marília de Castro Rodrigues Pappas
Leonardo Lopes Bhering
Betania Ferraz Quirino
Dario Grattapaglia*

Embrapa Agroenergia
Brasília, DF
2009

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Agroenergia

Parque Estação Biológica, PqEB s/n, Brasília, DF

Fone: (61) 3448-4246

Fax: (61) 3448-1589

www.cnpae.embrapa.br

sac@cnpae.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: José Manuel Cabral de Sousa Dias

Secretária-Executiva: Rachel Leal da Silva

Membros: Betânia Ferraz Quirino, Daniela Garcia Collares, Esdras Sundfeld.

Supervisão editorial: José Manuel Cabral de Sousa Dias

Revisão de texto: José Manuel Cabral de Sousa Dias

Normalização bibliográfica: Maria Iara Pereira Machado

Tratamento de ilustrações: Maria Goreti Braga dos Santos

Editoração eletrônica: Maria Goreti Braga dos Santos

Foto(s) da capa: Bruno Galvêas Laviola

1ª edição - 2009

Todos os direitos reservados

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Agroenergia

Avaliação da diversidade genética do banco de germoplasma de pinhão-manso por marcadores moleculares / Tatiana Barbosa Rosado ... [et al.]. – Brasília, DF: Embrapa Agroenergia, 2009.

16 p. – (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, ISSN 2177-0395;)

1. *Jatropha curcas* – recursos genéticos. 2. Agroenergia. I. Rosado, Tatiana Barbosa. II. Embrapa Agroenergia. III. Série.

Sumário

Resumo	4
Abstract	6
Introdução	7
Material e Métodos	8
Resultados e Discussão	16
Conclusões	22
Agradecimentos	23
Referências	23

Avaliação da Diversidade Genética do Banco de Germoplasma de Pinhão-mansinho por Marcadores Moleculares

*Tatiana Barbosa Rosado*¹

*Bruno Galvêas Laviola*²

*Marília de Castro Rodrigues Pappas*³

*Leonardo Lopes Bhering*⁴

*Betania Ferraz Quirino*⁵

*Dario Grattapaglia*⁶

Resumo

O pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) adquiriu significativo interesse econômico devido ao óleo de sua semente ter potencial para ser convertido em biodiesel. No entanto, para que sejam alcançadas produções em escala comercial é necessário o conhecimento da variabilidade genética disponível para o avanço do processo de ganho genético por seleção no melhoramento. Técnicas baseadas em marcadores moleculares podem ser usadas como alternativa para detectar fontes de variabilidade. Diante disso, este estudo objetivou estimar a diversidade genética de 192 acessos de pinhão manso de diferentes regiões do Brasil por marcadores RAPD e SSR. A análise de 23 locos RAPD revelou similaridade média de 0,89 e o dendrograma gerado pela metodo-

¹ Bióloga, DSc. em Genética e Melhoramento, bolsista da Embrapa Agroenergia, Brasília, DF, tatianarosado@yahoo.com.br

² Engenheiro Agrônomo, DSc. em Fitotecnia, pesquisador da Embrapa Agroenergia, Brasília, DF, bruno.laviola@embrapa.br

³ Bióloga, MSc. em Biologia Molecular, Pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF, mariliac@cenargen.embrapa.br

⁴ Engenheiro Agrônomo, DSc. em Genética e Melhoramento, pesquisador da Embrapa Agroenergia, Brasília, DF, leonardo.bhering@embrapa.br

⁵ Bióloga, DSc. em Biologia Celular e Molecular, pesquisador da Embrapa Agroenergia, Brasília, DF, betania.quirino@embrapa.br

⁶ Engenheiro Florestal, DSc. em Genética, Pesquisador da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF, dario@cenargen.embrapa.br

logia UPGMA apresentou três grupos principais, com 97% de acessos agrupados em um único grupo. Os seis locos SSR não permitiram a distinção dos acessos e foram em sua maioria homozigotos para todos os acessos avaliados. Os resultados revelaram que acessos de pinhão manso de diferentes regiões do Brasil possuem base genética estreita, causada provavelmente por uma ancestralidade comum, tornando-se necessária a introdução de acessos de pinhão manso do centro de origem ou diversidade da espécie para viabilizar o programa de melhoramento genético.

Termos para indexação: *Jatropha curcas*; recursos genéticos; agroenergia

Evaluation of Genetic Diversity in Jatropha Germplasm Bank by Molecular Markers

ABSTRACT

Jatropha curcas L., has acquired significant economic interest because its seed oil can be converted to biodiesel. However, in order to reach commercial-scale production is necessary to know the extent of genetic variability available to advance the process of genetic gain for selection in breeding. Techniques based on molecular markers can be used as an alternative to detect sources of variability. So this study aimed to estimate the genetic diversity of 192 accessions of *Jatropha* from different regions of Brazil by RAPD and SSR. The analysis of 23 RAPD loci showed average similarity of 0.89 and a dendrogram generated by UPGMA method showed three main groups, with 97% of requests grouped into a single group. The six SSR loci did not allow the distinction of hits and were mostly homozygous for all accessions. The results showed that *Jatropha* accessions from different regions of Brazil have a narrow genetic base, probably caused by a common ancestry, making necessary the introduction of *Jatropha* accessions from the specie's center of origin and /or diversity to sustain the breeding program.

Index-terms: Jatropha curcas; Genetic diversity, RAPD, SSR

INTRODUÇÃO

O pinhão manso (*Jatropha curcas* L), pertencente à família Euphorbiaceae, é um arbusto perene, nativo provavelmente da América Central e amplamente presente em toda a América Central, África e Ásia (BASHA et al., 2009). Tradicionalmente, sementes de pinhão manso e outras partes das plantas foram utilizadas para produção de óleo, sabão e medicamentos diversos (KOHLI et al., 2009). No entanto, a sua recente popularidade deve-se ao potencial do óleo de seus grãos poder ser usado como fonte de biodiesel. O pinhão manso é uma das únicas oleaginosas que não compete diretamente com a agricultura de alimentos e é compatível com perfil da agricultura familiar (LAVIOLA et al., 2009). O rendimento potencial do pinhão manso varia de 2 a 5 toneladas há-1 ano-1 dependendo do solo, nutrientes e condições de precipitação (FRANCIS et al., 2005). Os grãos contêm entre 30 e 35% de óleo que pode ser convertido por transesterificação em biodiesel com alta qualidade (BASHA et al., 2009).

Apesar das inúmeras potencialidades do pinhão manso, diversos fatores devem ser solucionados para completa domesticação da espécie. Dentre esses fatores o conhecimento da dimensão e amplitude da variabilidade genética disponível é essencial para o avanço e sustentabilidade do processo de ganho genético por seleção no melhoramento. Normalmente, a diversidade genética de uma espécie é armazenada em bancos de germoplasma que são fundamentais, pois permitem ao melhorista obter genes/alelos, a ser incorporados aos trabalhos de melhoramento genético além de evitar a erosão genética (BUENO et al., 2001). Diante disso, a Embrapa Agroenergia constituiu em parceria com a Embrapa Cerrados um banco de germoplasma com acessos coletados em diversas regiões do Brasil. Com exceção do local de coleta e informações sobre uma possível origem dos acessos, nada se sabe sobre a diversidade genética destes materiais.

Diversidade molecular estimada com marcadores moleculares neutros fornece uma estimativa rápida e precisa de ancestralidade entre aces-

tos, permitindo otimizar os esforços de melhoramento na constituição de populações e planejamento de cruzamentos visando maximizar a segregação e recuperação de genótipos superiores (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998). Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi determinar a diversidade genética existente entre acessos do banco de germoplasma de pinhão mansinho com base em marcadores moleculares RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) e SSR (Simple Sequence Repeats) visando a utilização dos mesmos em futuros trabalhos de melhoramento genético.

MATERIAL E MÉTODOS

Material genético

Para o estudo de diversidade genética foram usados 192 acessos de pinhão-mansinho componentes do banco de germoplasma, coletados em diferentes regiões do Brasil (Tabela 1). O DNA genômico total foi extraído de tecido foliar jovem de cada acesso segundo o protocolo proposto por Ferreira e Grattapaglia (1998). Para a maceração das folhas foi utilizado o equipamento TissueLyser da Qiagen com beads metálicas. A quantificação de DNA foi realizada utilizando-se espectrofotômetro NanoDrop, da Thermo Scientific e a concentração final ajustada para 10 ng μ L⁻¹.

Análise RAPD

Noventa e seis primers RAPD da Operon Technologies Inc. foram utilizados. A amplificação dos locos RAPD via PCR (Polymerase Chain Reaction) foi baseada no protocolo descrito por Ferreira e Grattapaglia (1998). O volume final de reação, de 13 μ L, foi composto de 3,0 μ L da solução de DNA (10 ng/ μ L), 1,3 μ L de tampão PCR 10X, 0,4 μ L de MgCl₂ (50 mM), 1,04 μ L de 10 mM de dNTP mix contendo 2,5 mM de cada um dos quatro nucleotídeos (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), 2 μ L de primer (10 ng/ μ L), 0,2 μ L de Taq DNA polimerase (5 U/ μ L) e água MiliQR esterilizada para completar o volume. As amplificações foram efetuadas em termociclador modelo PTC-100 (MJ Research Inc), em programa com uma etapa inicial de desnaturação de 94°C, 3 min seguido de 42 ciclos de 94°C por 30s, 32°C por 1 min para anelamento

do primer, 72°C por 2,5 min e 72°C por 4 min para extensão final.

Os produtos da PCR foram separados em gel de agarose (1,5%), a 120V, por aproximadamente 3h. Os géis foram fotografados sob luz ultravioleta, no sistema de fotodocumentação Eagle Eye II (Stratagene).

Análise SSR

Foram selecionados, com base na literatura disponível (SUN et al., 2008; PAMIDIMARRI et al., 2009; BASHA et al., 2009) seis locos microssatélites (tabela 2).

A amplificação dos microssatélites via PCR foi realizada utilizando o kit Multiplex PCR da Qiagen® num volume final de 5 μ l que continha: 2,5 μ L de PCR Master Mix e 0,5 μ L de Q-Solution; 0,1 μ L de cada primer a 10 μ M; 0,4 μ L de água RNase-free e 1,0 μ L de DNA a 2 ng/ μ L. A PCR foi realizada utilizando um programa com uma etapa inicial de desnaturação a 95°C por 15 min, seguidos de 35 ciclos de 95°C por 30 s, 35°C 90s e 72°C por 1 min, finalizando com uma etapa única de extensão final a 72°C por 30 min. Os locos foram amplificados em sistemas multiplex, onde cada loco do multiplex estava marcado com a fluorescência 6-FAM.

Tabella 1. Origem geográfica dos acessos de pinhão manso do banco de germoplasma

<i>Acesso</i>	<i>Origem Geográfica</i>	<i>Acesso</i>	<i>Origem Geográfica</i>	<i>Acesso</i>	<i>Origem Geográfica</i>
1	Rio Verde-GO	65	Plantio comercial-Jaiba-MG*	129	Arinos-MG
2	Santa Vitoria-MG	66	Plantio comercial-Jaiba-MG*	130	Arinos-MG
3	Santa Vitoria-MG	67	Plantio comercial-Jaiba-MG*	131	Minas Gerais
4	Santa Vitoria-MG	68	João Pinheiro-MG	132	Minas Gerais
5	Santa Vitoria-MG	69	João Pinheiro-MG	133	Minas Gerais
6	Santa Vitoria-MG	70	João Pinheiro-MG	134	Minas Gerais
7	Santa Vitoria-MG	71	João Pinheiro-MG	135	Minas Gerais
8	Santa Vitoria-MG	72	João Pinheiro-MG	136	Minas Gerais
9	Santa Vitoria-MG	73	João Pinheiro-MG	137	Minas Gerais
10	Santa Vitoria-MG	74	João Pinheiro-MG	138	Arinos-MG
11	Petrolina-PE	75	João Pinheiro-MG	139	Arinos-MG
12	Sete Lagoas-MG	76	João Pinheiro-MG	140	Minas Gerais
13	Umuarama-PR	77	João Pinheiro-MG	141	Minas Gerais
14	Xambré-PR	78	João Pinheiro-MG	142	Minas Gerais
15	S. José dos Campos-SP	79	Plantio comercial-Jaiba-MG*	143	Minas Gerais

Continua...

Tabela 1. Continuação.

16	S. Franc. do Gloria-MG	80	Pelotas-RS	144	Minas Gerais
17	Curvelo-MG	81	Pelotas-RS	145	Minas Gerais
18	Guapimirim-RJ	82	Pelotas-RS	146	Minas Gerais
19	Bom Jesus-RJ	83	Pelotas-RS	147	Minas Gerais
20	Belmiro Braga-MG	84	Curvelo-MG	148	Minas Gerais
21	Belmiro Braga-MG	85	Sete Lagoas-MG	149	Minas Gerais
22	Maranhão	86	Curvelo-MG	150	Uberlândia-MG
23	Maranhão	87	S. Franc. de Assis-RS	151	Uberlândia-MG
24	Maranhão	88	BAG-UFLA-Lavras-MG*	152	Uberlândia-MG
25	Maranhão	89	BAG-UFLA-Lavras-MG*	153	Plantio comercial- Anápolis-GO*
26	Maranhão	90	BAG-UFLA-Lavras-MG*	154	Jales-SP
27	Maranhão	91	BAG-UFLA-Lavras-MG*	155	Jales-SP
28	Maranhão	92	BAG-UFLA-Lavras-MG*	156	Porangatu-GO
29	Maranhão	93	BAG-UFLA-Lavras-MG*	157	Porangatu-GO
30	Maranhão	94	BAG-UFLA-Lavras-MG*	158	BAG-CPAO - Dourados- MS
31	Maranhão	95	BAG-UFLA-Lavras-MG*	159	BAG-CPAO-Dourados- MS

Continua...

Tabela 1. Continuação.

32	Maranhão	96	BAG-UFLA-Lavras-MG*	160	Minas Gerais
33	Maranhão	97	BAG-UFLA-Lavras-MG*	161	Minas Gerais
34	Maranhão	98	BAG-UFLA-Lavras-MG*	162	Minas Gerais
35	Maranhão	99	BAG-UFLA-Lavras-MG*	163	Minas Gerais
36	Maranhão	100	BAG-UFLA-Lavras-MG*	164	Minas Gerais
37	Maranhão	101	BAG-UFLA-Lavras-MG*	165	Minas Gerais
38	Maranhão	102	BAG-UFLA-Lavras-MG*	166	Minas Gerais
39	Maranhão	103	BAG-UFLA-Lavras-MG*	167	Minas Gerais
40	Maranhão	104	BAG-UFLA-Lavras-MG*	168	Minas Gerais
41	Maranhão	105	BAG-UFLA-Lavras-MG*	169	Minas Gerais
42	Maranhão	106	BAG-UFLA-Lavras-MG*	170	Minas Gerais
43	Maranhão	107	BAG-UFLA-Lavras-MG*	171	Minas Gerais
44	Maranhão	108	BAG-UFLA-Lavras-MG*	172	Minas Gerais
45	Candeias-BA	109	Ribeirão Preto-SP	173	Minas Gerais
46	Paraná	110	S. Franc. do Glória-MG	174	Minas Gerais
47	Janaúba-MG	111	S. Miguel do Araguaia-GO	175	Minas Gerais

Continua...

Tabela 1. Continuação.

48	Janaúba-MG	112	S. Miguel do Araguaia-GO	176	Minas Gerais
49	Janaúba-MG	113	S. Miguel do Araguaia-GO	177	Minas Gerais
50	Janaúba-MG	114	S. Miguel do Araguaia-GO	178	Minas Gerais
51	Janaúba-MG	115	Paraná	179	Sertanópolis-PR
52	BAG-EPMIG-Nova Porteira-MG	116	Paraná	180	Sidrolândia-MS
53	BAG-EPMIG-Nova Porteira-MG	117	Paraná	181	Rio Grande do Sul
54	BAG-EPMIG-Nova Porteira-MG	118	Paraná	182	Rio Grande do Sul
55	BAG-EPMIG-Nova Porteira-MG	119	São Francisco do Glória-MG	183	Rio Grande do Sul
56	BAG-EPMIG-Nova Porteira-MG	120	Agua de Santa Bárbara-SP	184	Rio Grande do Sul
57	BAG-EPMIG-Nova Porteira-MG	121	Agua de Santa Bárbara-SP	185	Campina Grande-PB
58	BAG-EPMIG-Nova Porteira-MG	122	Agua de Santa Bárbara-SP	186	Campina Grande-PB
59	BAG-EPMIG-Nova Porteira-MG	123	Barra dos Bugres-MT	187	Campina Grande-PB
60	Nova Porteira-MG	124	Barra dos Bugres-MT	188	Campina Grande-PB

Continua...

Tabela 1. Continuação.

61	Nova Porteirinha-MG	125	Petrolina-PE	189	Pará
62	Nova Porteirinha-MG	126	Apucarana-PR	190	Pará
63	Nova Porteirinha-MG	127	Apucarana-PR	191	Plantio comercial-MG*
64	Janaúba-MG	128	Pirassununga-SP	192	Plantio comercial-MG*

* Origem real desconhecida.

Tabela 2. Características dos seis locos microssatélites

<i>Marcador (No. GenBank)</i>	<i>Sequencia do primer (5'-3')</i>	<i>T_a (°C)</i>	<i>Motivo da repetição</i>	<i>Tamanho médio do alelo (pb)</i>
jc06 (EU586346)	F:CCAGAAAGTAGAATTATAAATTTAAA R:AGCGGCTCTGACATTATGTAC	44.0	(AT)3G(TA)3... (CT)3...(GT)5CT(GT)3	288/305
jc09 (EU586347)	F:GTACTTAGATCTCTTTGTAACATAACAG R:TATCTCTTGTTCAGAAATGGAT	48.0	(GT)3GC(TG)2A(GT)3	140/132
jc10 (EU586340)	F:CATCAAAATGCTAATGAAAGTACA R:CACACCTAGCAAACTACTTTGCA	46.5	(TG)6CACGCA(TG)4	108/122
jc20 (EU586348)	F:ACAGCAAAGTGCACAACAATCTCA R:TACTGCAGATGGATGGCATGAA	55.0	(TG)12(GA)22	260/278
jc24 (EU586341)	F:GGATATGAAGTTTCATGGGACAAG R:TTCATTGAATGGATGGTTGTAAGG F: AACACACCCATGGGCCACAGGT R:TGCATGTGTGCGGGTTTGATTAC	51.0	(CA)5(TA)8(CA)4... (TA)3GA(TA)4	204/216
jc41 (EU586342)		56.6	(CA)6(TA)2	102/114

T_a: temperatura de anelamento; pb: pares de bases

Os produtos amplificados via PCR foram submetidos à eletroforese capilar em sequenciador automático ABI3100 (Applied Biosystems). De cada amostra foi utilizado 1 μ l da PCR e adicionado 1 μ l de size standart marcado com fluorescência ROX, desenvolvido por Brondani e Grattapaglia (2001), e 8 μ l de formamida Hi-Di. A placa contendo as amostras foi mantida a 95 °C por 5 min e resfriada em gelo. As corridas eletroforéticas seguiram protocolo padrão do ABI3100 para fragmentos e as análises dos picos foram feitas utilizando os softwares GenScan e Genotyper (Applied Biosystems). O software Allelobin (IDURY e CARDON, 1997) foi utilizado para obtenção dos valores em pares de base para cada alelo.

Análises Estatísticas

As distâncias genéticas entre os acessos foram estimadas a partir dados moleculares de RAPD pelo coeficiente de similaridade de Jaccard $a/(n-d)$ em que a = número de coincidências positivas (tipo 1-1), n = número total de amostras e d = número de coincidências negativas (tipo 0-0). A partir das informações provenientes das matrizes de distância, foram feitas análises de agrupamentos por meio dos métodos de otimização de Tocher, ligação média entre grupos (UPGMA) e projeção de distância em espaço bidimensional. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa GENES (CRUZ, 2008).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os 96 iniciadores RAPD amplificaram 381 locos, dos quais 23 foram polimórficos (6,2%). Os locos polimórficos foram amplificados por 13 iniciadores, com média de 1,9 e amplitude de 1 a 4 locos polimórficos por iniciador. A matriz de similaridade gerada pelo Índice de Jaccard revelou variação de 0,14 a 1,0 entre os acessos e similaridade média de 89% comparável a média de similaridade obtida por Sun et al. (2008) em 58 genótipos de pinhão manso da China (92%) via marcadores AFLP.

Os menores índices de similaridade foram observados nas comparações entre o acesso 65 (Minas Gerais) e o acesso 1 (Rio Verde -GO)

e o acesso 153 (Anápolis -GO), cujos índices de similaridade foram de 0,11 e 0,35, respectivamente. Similaridade igual a 1 foi verificada entre vários acessos da mesma região, como 3 e 7 (Santa Vitória - MG), 144 e 148 (Minas Gerias), 120 e 122 (Águas de Santa Bárbara - SP), 150 e 152 (Uberlândia - MG), 183 e 184 (Rio Grande do Sul), 187 e 188 (Campina Grande - PB), sugerindo que esses acessos possam ser réplicas no banco de germoplasma.

Pelo resultado da hierarquização dos genótipos pelo método UPGMA (Figura 1), ao se adotar um percentual de similaridade genética de aproximadamente 35% constatou-se a formação de três diferentes agrupamentos heteróticos, dos quais um grupo foi unitário constituído pelo acesso 153, o segundo formado pelos acessos 65, 66, 67 e 79 e o terceiro grande grupo constituído pelos demais 187 acessos.

Como pode ser verificado no gráfico gerado pela projeção de distância (figura 2), os acessos coletados em plantios comerciais (65, 66, 67, 79 e 153) são divergentes comparados à maior parte dos acessos. Estes materiais provavelmente são resultantes de introduções mais recentes e/ou de regiões/locais distintos dos outros materiais presentes no território nacional. Os acessos divergentes poderão ser usados para aumentar a base genética nas populações de melhoramento e contribuir para maximizar o ganho genético entre os ciclos de seleção, uma vez que são fontes de alelos que não estão presentes na maior parte das procedências encontradas no Brasil. Assim, podem ser usados através de combinações híbridas para criar variabilidade para caracteres qualitativos e quantitativos de interesse ao melhoramento.

O método de otimização de Tocher resultou em 7 grupos (Tabela 3). O acesso 153 formou um grupo unitário como no método UPGMA e na projeção de distância, mas diferentemente do UPGMA, o acesso 79 ficou em um grupo distinto dos acessos 65, 66 e 67. Os acessos 165 e 166, procedentes de Minas Gerais, formaram. Cada um, dois grupos distintos. Um outro grupo foi formado pelos acessos 38, proveniente do Maranhão, e 135 e 176 de Minas Gerais. Os outros 182 acessos

(94%) formaram um grande grupo composto por acessos de diferentes origens enquanto que, em alguns casos acessos de mesma origem ficaram em grupos distintos, como os acessos 166 (grupo 6) e 165 (grupo 7) de Minas Gerais e os acessos 153 (grupo 5) e 79 (grupo 4) de Jaíba-MG.

A formação de um grupo principal, em ambos os métodos de análise, composto pela maior parte acessos evidenciou claramente que acessos de diferentes regiões do Brasil possuem uma ancestralidade comum, não existindo, portanto, diversidade genética por origem. Resultados semelhantes foram observados no estudo de diversidade genética realizado por Basha e Sujatha (2007) com 48 genótipos de diferentes regiões da Índia e um do México. A partir de marcadores RAPD e SSR estes autores verificaram que 83% dos acessos indianos avaliados foram agrupados em dois grandes grupos enquanto o acesso do México formou um grupo unitário. Em outro estudo, Basha et al. (2009), estudando genótipos de *J. curcas* de várias regiões do mundo verificaram apenas dois agrupamentos, um composto por acessos da região da América Central, enquanto o outro formado por outras regiões do mundo.

Os resultados apresentados evidenciam claramente que a baixa diversidade existente para *J. curcas* concentra-se no provável centro de origem e/ou diversidade dessa espécie e que no Brasil, assim como em vários outros países, a diversidade genética disponível é muito limitada, tendo provavelmente como causa poucas introduções iniciais. Ademais, esses resultados também refletem o modo de propagação, o comportamento reprodutivo e o modo de uso histórico da planta.

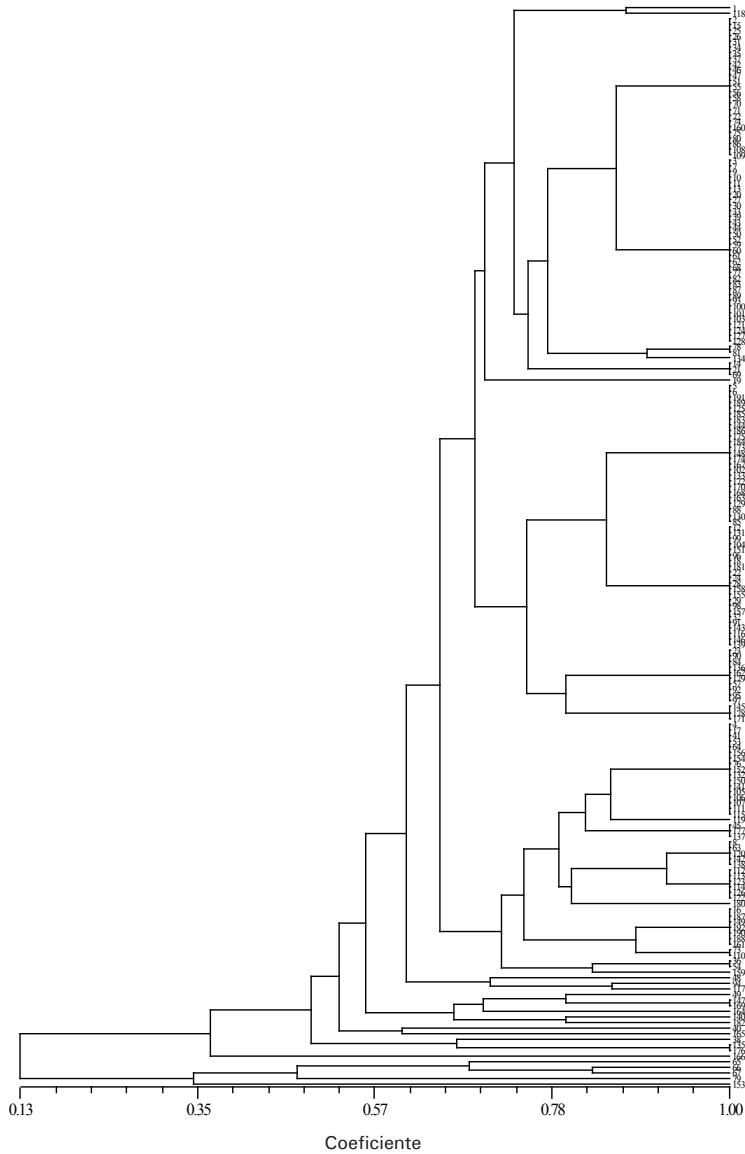


Fig. 1. Dendrograma gerado pelo método UPGMA, a partir das similaridades dos 192 genótipos de pinhão manso baseados em marcadores RAPD

Os locos SSR analisados amplificaram fragmentos de tamanho esperado. Cada primer SSR produziu um a dois alelos sendo que no total 10 alelos foram detectados. Contudo, apenas um loco SSR foi polimórfico para sete acessos e os outros cinco resultaram em produtos monomórficos, não permitindo distinguir os 192 acessos de *J. curcas* estudados. Comparavelmente, em estudo realizado por Sun et al. (2008) 17 marcadores microssatélites não permitiram separar os 58 acessos chineses avaliados. Basha et. al. (2009), verificaram que apenas acessos do México e de El Salvador tiveram variação com 12 marcadores microssatélites, enquanto acessos de outros países também não foram distinguíveis.

Em uma espécie monóica, como o pinhão manso, é esperado que os locos estejam em heterozigose, devido à predisposição para ocorrência de alogamia. No entanto, neste estudo, todos os locos microssatélites foram homozigotos com exceção do JC-41. Semelhantemente, Sun et al. (2008) também verificaram homozigose para 16 pares de loci de SSR em 58 acessos de pinhão manso na Índia. Tais resultados indicam que os acessos de pinhão manso presentes no Brasil estão se reproduzindo preferencialmente por autogamia, sendo facilitada pela ocorrência isolada das plantas no território nacional. Podemos inferir também que apesar de *J. curcas* ter uma estreita base genética possui uma alta plasticidade fenotípica que lhe permitiu adaptação ampla a vários ambientes.

CONCLUSÕES

A variação genética entre acessos de pinhão manso coletados no território brasileiro é baixa (base genética estreita), sendo causada provavelmente por uma ancestralidade comum na introdução do pinhão-manso no Brasil.

Visando sustentar um programa de melhoramento com ganhos genéticos contínuos a médio e longo prazos é essencial a introdução de acessos de pinhão manso do centro de origem e/ou diversidade.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa concedida; Aos produtores, empresas e pesquisadores pela fundamental contribuição nas atividades de prospecção e coleta dos acessos de pinhão manso.

REFERÊNCIAS

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, n. 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, n. 156, p. 375-386, 2007.

BRONDANI, R. P.; GRATTAPAGLIA, D. Cost-effective method to synthesize a fluorescent internal DNA standard for automated fragment sizing. *Biotechniques*, Natick, US, v. 31, p. 793-795, 2001.

BUENO, L. C. de S.; MENDES, A. N. G.; CARVALHO, S. P. *Melhoramento genético de plantas*. Minas Gerais: Editora UFLA, 2001.

CRUZ, C. D. *Programa genes: diversidade genética*. Viçosa, MG: UFV, 2008. 278 p.

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

FRANCIS, G.; EDINGER, R.; BECKER, K. A concept for simultaneous wasteland reclamation, fuel production, and socio-economic development in degraded areas in India: need, potential and perspectives of *Jatropha* plantations. ***Nature and Resources***, Paris, Forum 29, p. 12–24, 2005.

IDURY, R. M.; CARDON, L. R. A simple method for automated allele binning in microsatellite markers. ***Genome Research***, Cold Spring Harbor, v. 7, p. 1104-1109, 1997.

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 BRASILEIRO DE PLANTAS OLEAGINOSAS, ÓLEOS, GORDURAS E BIODIESEL, 6., 2009, Montes Claros. ***Anais...*** Lavras: UFLA, 2009. v. 6.

KOHLI, A. ; POPLUECHAI, S.; RAORANE, M.; SYERS, K. J.; O'DONNELL, A. G. *Jatropha* as a novel non-edible oilseed plant for biodiesel. In: FERRY, N.; GATEHOUSE, A. M. R. (Ed.). ***Environmental impact of genetically modified novel crops***. London: CAB International, 2009. p. 294–322. Chapter 14.

PAMIDIMARRI, D. V. N. S.; SINGH, S.; MASTAN, S. G. M.; 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, n. 6, p. 1357-1364, 2009.

SUN, Q. B.; LI, L. F.; 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, n. 48, p. 1865-1870, 2008.