



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**RAMON DA SILVA RAPOSO**

**ANÁLISE GENÔMICA DO PINHÃO MANSO (*JATROPHA*  
*CURCAS* L.): DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES  
MOLECULARES**

**TERESINA-PI**  
**2013**

RAMON DA SILVA RAPOSO

ANÁLISE GENÔMICA DO PINHÃO MANSO (*Jatropha curcas* L.):  
DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES MOLECULARES

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste em Biotecnologia (RENORBIO) - EMBRAPA - Universidade Federal do Piauí, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Biotecnologia.

**Área de Concentração:** Biotecnologia em Agropecuária

**Orientador:** Prof. Dr. Fábio Mendonça Diniz

TERESINA-PI  
2013

## FICHA CATALOGRÁFICA

Serviço de Processamento técnico da Universidade Federal do Piauí  
Biblioteca Comunitária Jornalista Carlos Castello Branco

R219a      Raposo, Ramon da Silva  
              Análise Genômica do Pinhão Manso (*Jatropha curcas* L.):  
Desenvolvimento de Marcadores Moleculares/ Ramon da Silva  
Raposo. – 2013.  
              100 f.

Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação da Rede  
Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO), EMBRAPA, Universidade  
Federal do Piauí, 2013.

“Orientador: Prof. Dr. Fábio Mendonça Diniz”.

1. *Jatropha curcas*. 2. Diversidade. 3. Marcadores Moleculares.  
4. Microsatélites. 5. Polimorfismo. I. Título.

CDD: 572.86

**Título:** Análise Genômica do Pinhão Manso (*Jatropha curcas* L.): Desenvolvimento de Marcadores Moleculares

**Autor:** Ramon da Silva Raposo

**Defesa:** 20/06/2013

**Banca examinadora:**

---

Prof. Dr. Fábio Mendonça Diniz (EMBRAPA)  
**Orientador**

---

Prof. Dr. Renato de Azevedo Moreira (UNIFOR)  
**Examinador**

---

Prof. Dr. José Ferreira Nunes (UECE)  
**Examinador**

---

Profa. Dra. Alana de Freitas Pires (UECE)  
**Examinador**

---

Profa. Dra. Raimunda Hermelinda Maia Macena (UFC)  
**Examinador**

*A Deus, pelo mistério da salvação em Cristo Jesus,  
Edyane (esposa), Ramon Filho, Renan e Gabriella (filhos),  
Risaldo e Norma (pais), minha família  
Cheia de felicidade!*

*Dedico*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por Sua maravilhosa Graça e por Sua manifestação revelada em Cristo Jesus.

À Universidade Federal do Piauí (UFPI) e à Embrapa Meio-Norte, em seus Professores, Pesquisadores, Técnicos, Funcionários e Estagiários, pela oportunidade de acolhida, boa convivência e troca de conhecimentos.

À Rede Nordeste de Biotecnologia – Ponto Focal do Piauí (RENORBIO-PI) na pessoa da coordenadora, Maria Acelina Martins de Carvalho, e do secretário, Rhuan Marques de Sousa, pela atenção e orientações, principalmente durante o período de qualificação e defesa da tese.

À Secretaria de Educação do Estado do Ceará, pela atenção em conceder liberação para as atividades de doutorado.

À Universidade de Fortaleza, através do Centro de Ciências da Saúde (CCS), na pessoa do diretor Flávio Lúcio Pontes Ibiapina, pelo apoio em todas as fases do doutorado.

Ao Centro Universitário Estácio-Fic, pela prestimosa atenção dada nas etapas finais de qualificação e defesa de tese.

À minha Esposa, Edyane, e aos meus filhos, Ramon Filho, Renan e Gabriella, pela companhia, compreensão e total apoio durante todo esse projeto de vida! Família é fundamental em todos os momentos da nossa história!

Aos meus Pais, Norma Maria Raposo e Risaldo da Silva Raposo, pela semente da dignidade e da humildade, plantada em mim desde a concepção! Também por todo o afeto e sentimento verdadeiro de bem-querer!

Aos meus sogros, Edgildo e Eliane Barroso pela torcida por meu sucesso e também apoio aos meus filhos em vários momentos em que estive ausente!

Ao Prof. Dr. Fábio Mendonça Diniz, por ter feito o ofício da orientação de uma forma mais completa possível! Orientador, motivador, amigo, hospitaleiro, conselheiro!

Ao Prof. Dr. Renato de Azevedo Moreira, exemplo de profissional brilhante! Por todas as oportunidades profissionais e pessoais que me concedeu. Grato por sua amizade e consideração.

Ao Prof. Dr. José Ferreira Nunes, pelo estímulo e incansável dedicação ao desenvolvimento da Ciência! Grato pela convivência na Graduação, Mestrado e Doutorado!

À Profa. Dra. Adriana Rolim Campos Barros, pela amizade e forte companheirismo profissional! Grato por seu apoio.

À Profa. Dra. Raimunda Hermelinda Maia Macena, pela amizade, coleguismo durante o nosso tempo de faculdade e prestimosa atenção em participar como membro da banca examinadora.

À Profa. Dra. Alana de Freitas Pires, pela amizade e coleguismo profissional! Grato em participar como membro da banca examinadora.

*“A vitória mais bela que se pode alcançar é vencer a si mesmo”*

Santo Inácio de Loyola



## RESUMO

A presente tese foi concebida a partir de experimentos realizados no Laboratório de Biotecnologia e Biologia Molecular da EMBRAPA Meio Norte, Teresina-PI. O pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) é uma planta oleaginosa, da família Euphorbiaceae, perene, de provável origem da América Central. Com as atuais urgências de substituição dos combustíveis fósseis por outros que promovam o desenvolvimento das nações de forma sustentável, a *Jatropha curcas* L. passou a ter importante papel no fornecimento de combustível renovável. O desenvolvimento de marcadores moleculares pode auxiliar no melhoramento genético de cultivares comerciais. Este trabalho teve como objetivo desenvolver marcadores microsatélites a partir de uma biblioteca genômica duplamente enriquecida (capítulo II) e de uma coleção de sequências genômicas (*Genome Sequence Survey – GSS*) (capítulo III). No capítulo II, de um total de 23 microsatélites foram identificados e caracterizados 8 locus polimórficos. Em 50 acessos provenientes da Guatemala, o tamanho dos alelos variou de 88 a 285pb. O número médio de alelos por locus e a riqueza alélica foram  $5.5 \pm 1.4$  e  $5.4 \pm 1.4$ , respectivamente. Os marcadores apresentaram elevado índice médio de heterozigosidade observada ( $0,684 \pm 0,074$ ) e de heterozigosidade esperada ( $0,653 \pm 0,074$ ). No capítulo III, 20 sequências microsatélites foram amplificadas com sucesso. Genotipagem de acessos de *J. curcas* provenientes da Guatemala revelaram 18 locus polimórficos. O número médio de alelos por locus foi de 6.9 e os alelos variaram de 94 a 299pb. Heterozigosidade esperada e observada variaram de 0.118 a 0.906 e de 0.082 a 0.794, respectivamente. Valores do PIC variaram de 0.114 (JcSSR-34) a 0.886 (JcSSR-33) com uma média de 0.627. Esses marcadores microsatélites são ferramentas úteis para a determinação da estrutura genética e diversidade em *J. curcas*.

**Palavras-chave:** *Jatropha curcas*, Diversidade, Marcadores moleculares, Microsatélites, Polimorfismo.

## ABSTRACT

The present thesis was conceived due to experiments done in at the biotechnological & molecular biological laboratory of EMBRAPA Mid North, Teresina-PI. The physic nut (*Jatropha curcas* L.) is an oleaginous plant, a perennial bush-tree from the Euphorbiaceae family and possibly native of Central America. With the new urgencies of substitution of fossil fuel by others that promote the development of the nations of sustainable form, the *Jatropha curcas* L. it started to play an important role in providing renewable fuel. The development of the molecular markers can help the genetic improvement of comercial crops. The aim of this work was to develop microsatellites markers from the points of the construction of double-enriched genomic libraries (chapter II) and based in *Genome Sequence Survey – GSS* (chapter III). In chapter II, from a total number of 23 microsatellites, 8 polymorphic loci were identified and characterized. The allelic sizes ranged from 88 to 285 bp, in 50 accessions from Guatemala. The average number of alleles per locus and allelic richness were  $5.5 \pm 1.4$  and  $5.4 \pm 1.4$ , respectively. The markers averaged high levels of observed ( $0,684 \pm 0,074$ ) and expected ( $0,653 \pm 0,074$ ) heterozygosities. In chapter III, Twenty microsatellite sequences were successfully amplified resulting in repeatable and scorable PCR products. Genotyping of *J. curcas* accessions from the Guatemalan population revealed 18 polymorphic loci. The average number of alleles per locus was 6.9 and allelic sizes ranged from 94 to 299 bp. Expected and observed heterozygosities ranged from 0.118 to 0.906 and from 0.082 to 0.794, respectively. PIC values ranged from 0.114 (JcSSR-34) to 0.886 (JcSSR-33) with an average of 0.627.

These microsatellites markers are useful tools for the determination of genetic structure and diversity in *J. curcas*.

**Palavras-chave:** *Jatropha curcas*, Diversity, Molecular markers, Microsatellites, Polymorphism.

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo I

Table 1.1 Principais formas de obtenção de energia. 17

Table 1.2 Principais características de marcadores moleculares utilizados em estudos de diversidade genética da *Jatropha curcas* L. 38

### Capítulo II

Table 2.1 List of probes and combinations used for microsatellite isolation from *Jatropha curcas* and their respective melting temperatures. 50

Table 2.2 Characteristics of microsatellite loci developed for *Jatropha curcas*. 61

Table 2.3 Characterization of eight primer pairs that amplify polymorphic short tandem repeats from *Jatropha curcas*. 64

### Capítulo III

Table 3.1 Microsatellite marker information based on the candidate sequence. 78

Table 3.2 Characteristics of 20 GSS-derived microsatellites from *Jatropha curcas* 80

## LISTA DE FIGURAS

### Capítulo I

Figura 1.1 Esquema de como se originou o Petróleo	18
Figura 1.2 Esquema de como ocorre o aquecimento global	18
Figura 1.3 Esquema simplificado do processo de fabricação do bioetanol	20
Figura 1.4 Esquema simplificado do processo de transesterificação	20
Figura 1.5 Esquema do uso sustentável do biodiesel	21
Figura 1.6 Pinhão Manso ( <i>Jatropha curcas</i> L.)	23
Figura 1.7A Frutos jovens de Pinhão Manso	24
Figura 1.7B Frutos maduros de Pinhão Manso	24
Figura 1.8 Banco Ativo de Germoplasma (BAG) de Pinhão Manso da Embrapa Cerrados-DF	25
Figura 1.9 Distribuição de <i>Jatropha curcas</i> e possíveis centros de diversidade	28

### Capítulo II

Figura 2.1 Diagram of the enrichment strategy used in this study	48
Figura 2.2 Gráfico representation of SNX linkers	50
Figura 2.3 A subset of genomic DNA extractions, obtained by DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) from fresh young leaves	54

Figura 2.4 An inverted tone of an ethidium bromide stained agarose gel (1%) showing the results of restriction of <i>Jatropha</i> DNA	55
Figura 2.5 An inverted tone image of an ethidium bromide stained agarose gel (1.5%), showing the PCR products of the enriched DNA	57
Figura 2.6 An inverted tone image of an ethidium bromide stained agarose gel (1.5%), showing the PCR products of the double-enriched DNA	58
Figura 2.7 An inverted tone image of an ethidium bromide stained agarose gel (1.5%), showing the results of a subset of the size screening PCR	59
Figura 2.8 Distribution of microsatellite loci in <i>Jatropha curcas</i> . Loci are grouped by repeat length for provisional multiplex PCRs	60
Figura 2.9 Distributions of allele frequencies at the eight polymorphic microsatellite loci in <i>J. curcas</i> populations	65

### **Capítulo III**

Figura 3.1 Distribution of microsatellite loci in <i>Jatropha curcas</i>	82
Figura 3.2 Distributions of allele frequencies at the 17 polymorphic microsatellite loci in <i>Jatropha curcas</i> populations	83

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AFLP	<i>Amplified Fragment Length Polymorphic</i> (Polimorfismo de comprimento de fragmento amplificado)
ANP	Agencia Nacional do Petróleo
API	Altura da Primeira Inflorescência
BAG	Banco Ativo de Germoplasma
B2	2% de biodiesel na mistura combustível
B5	5% de biodiesel na mistura combustível
B20	20% de biodiesel na mistura combustível
B100	100% de biocombustível (biodiesel puro)
(CA) <sub>n</sub>	Dinucleotídeo citosina-adenina
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
DC	Diâmetro de caule
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNases	Desoxirribonuclease
ER	Enzima de restrição
EST	Esterase
(GAC) <sub>n</sub>	Trinucleotídeo guanina-adenina-citosina
(GATA) <sub>n</sub>	Tetranuceotídeo guanina-adenina-timina-citosina
GOT	Glutamato oxalacetato transaminase
ISSR	<i>Inter Simple Sequence Repeats</i>
Juv	Juvenilidade
Kg	Kilogramas
L.	Linnaeus
MDA	Ministério do Desenvolvimento Agrário
NRS	Número de ramos secundários
O <sub>2</sub>	Oxigênio
PC - linha	Projeção da copa na linha
PC - entre	Projeção da copa na entrelinha
PCR	Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase)
PNPB	Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel
PO	Peroxidase

Prod. grãos	Produção de grãos
pH	Potencial hidrogeniônico
RAPD	<i>Random A mplified Polimorphic DNA</i> (fragmentos polimórficos de DNA)
RENORBIO	Rede Nordeste de Biotecnologia
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polimorphism</i> (Polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição)
SSR	<i>Simple Sequence Repeats</i> (sequencia simples repetitiva)
UFPI	Universidade Federal do Piauí
%	Porcentagem (Porcentagem)
>	Maior que
°C	Graus Celsius
μl	Microlitros
μM	Micromolar

## SUMÁRIO

1. Capítulo I – Estado da arte e escolha de marcadores moleculares.....	17
1.1 A demanda mundial por energia renovável.....	17
1.2 O biodiesel como fonte de energia veicular limpa.....	20
1.3 O Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel (PNPB).....	22
1.4 <i>Jatropha curcas</i> L. como a “planta do biodiesel”.....	23
1.4.1 Classificação botânica.....	36
1.4.2 Sinônimos e nomes comuns.....	27
1.4.3 Uma planta com “finalidades múltiplas”.....	27
1.4.3.1 Características medicinais.....	27
1.4.3.2 Outras finalidades.....	28
1.5 Centro de origem e diversidade.....	28
1.6 Importância da diversidade genética.....	29
1.7 Uso de marcadores genéticos no estudo da diversidade genética da <i>Jatropha curcas</i> L. ....	30
1.7.1. Uso de marcadores genético-morfológicos.....	31
1.7.2. Uso de marcadores genético-moleculares.....	32
1.7.2.1 Marcadores enzimáticos.....	32
1.7.2.1.1 Isoenzimas.....	32
1.7.2.2 Marcadores de DNA.....	34
1.7.2.2.1 <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> (RFLP).....	34
1.7.2.2.2 <i>Random Amplified Polimorphic DNA</i> (RAPD).....	34
1.7.2.2.3 <i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i> (AFLP).....	36
1.7.2.2.4 <i>Inter Simple Sequence Repeats</i> (ISSR).....	37
1.7.2.2.5 <i>Simple Sequence Repeats</i> (SSR).....	38
1.8 Considerações finais.....	39
2. Justificativa .....	40
3. Hipóteses Científicas.....	42
4. Objetivos.....	43
5. Capítulo II – Isolation and characterization of new <i>Jatropha curcas</i> polymorphic markers from microsatellite Double-enriched genomic libraries.....	44



6. Capítulo III – Development of novel SSR markers for <i>Jatropha curcas</i> from genomic sequence survey database.....	70
7. Considerações finais.....	88
8. Referencias.....	89

### 1. INTRODUÇÃO

#### 1.1. A demanda mundial por energia renovável

Atualmente, para todas as nações, o setor de energia é considerado prioridade e certamente aquele que pode definir o progresso econômico de um país (TORAL et al., 2008). A nossa história é marcada de toda uma intensa busca por geração de energia, onde se teve um aumento exponencial durante o processo de industrialização, através da máquina à vapor e posteriormente pelo uso do petróleo como fonte de energia, conhecido como revolução industrial (POMPELLI et al., 2011).

A obtenção de energia é possível por meio de várias maneiras: usinas hidrelétricas, usinas nucleares, usinas eólicas, biocombustíveis (Tabela 1). Mas a primeira e, até hoje, principal fonte de energia que utilizamos é a energia fóssil (GOLDEMBERG, 2009), não renovável, que é obtida de diversas formas.

**Tabela 1.1.** Principais formas de obtenção de energia.

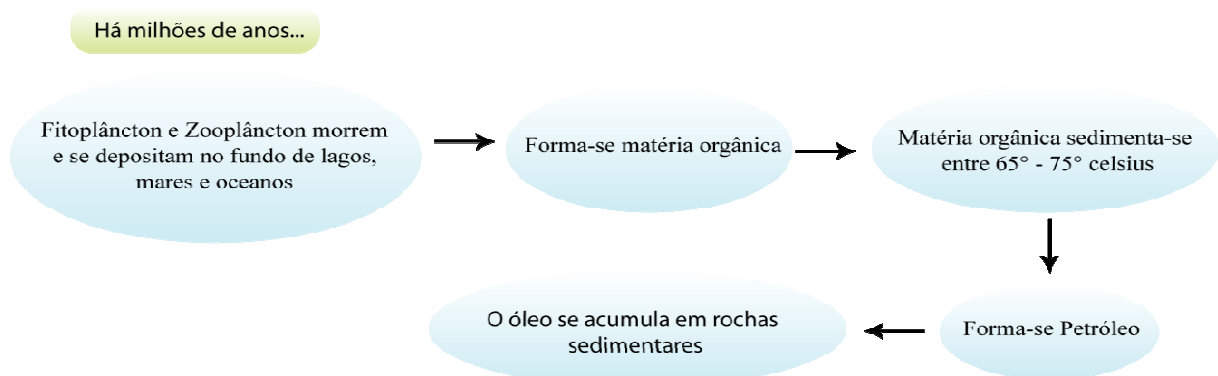
<b>Tipo de Energia</b>	<b>Classe</b>	<b>Forma de obtenção</b>
<b>Petróleo</b>	Não Renovável	Através da perfuração profunda de jazidas localizadas na crosta terrestre.
<b>Carvão Mineral</b>	Não Renovável	Através das “lavras” de carvão a céu aberto ou subterrânea.
<b>Gás Natural</b>	Não Renovável	Através da perfuração de jazidas na forma de reservatórios profundos no subsolo.
<b>Hidrelétrica</b>	Renovável	Através da transformação de energia potencial em cinética pela queda d’água de represas elevadas.
<b>Eólica</b>	Renovável	Através da conversão da energia cinética de translação em de rotação por meio de aerogeradores.
<b>Biocombustíveis</b>	Renovável	Através, principalmente, da extração de plantas oleaginosas.

A energia fóssil é uma fonte de energia não sustentável que é representada pelo petróleo (principalmente), carvão mineral e gás natural. Mais de 80% da energia primária

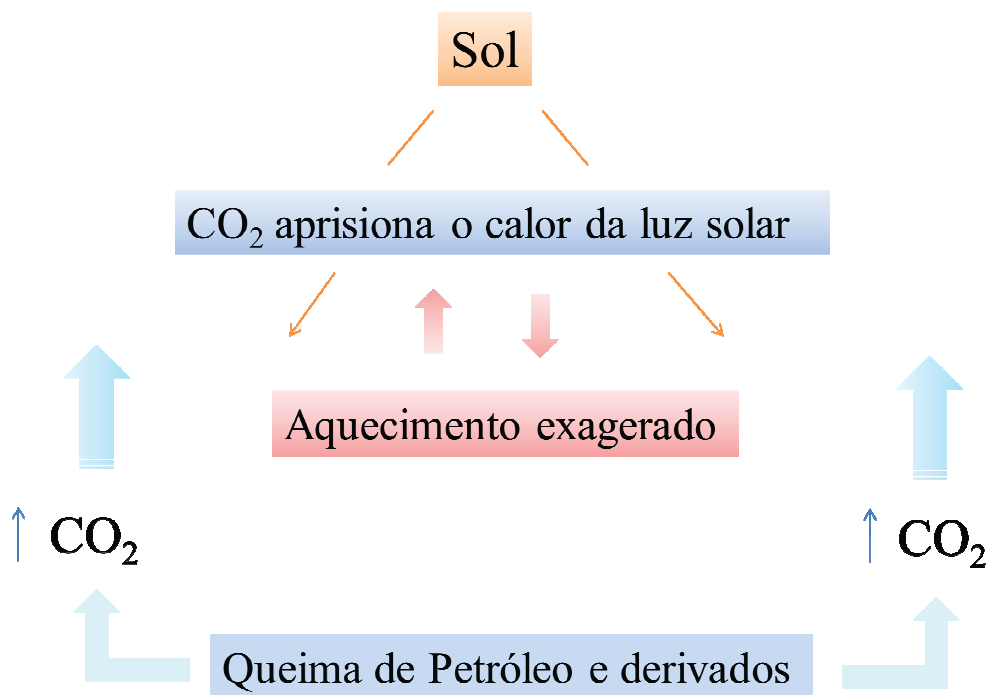
consumida no mundo é proveniente desses combustíveis fósseis (LINDFELDT; WESTERMARK, 2009).

O combustível fóssil é reconhecidamente finito, pois o petróleo surgiu da deposição de fitoplânctons e zooplânctons há milhões de anos (Figura 1.1), e poluente, pois o mesmo é gerador de um considerável aumento na concentração de CO<sub>2</sub> na atmosfera (PETTERSSON; HARVEY, 2010), ocasionando o efeito estufa (*greenhouse effect*) que, conseqüentemente, leva ao aquecimento global (Figura 1.2).

**Figura 1.1.** Esquema de como se originou o Petróleo.



**Figura 1.2.** Esquema de como ocorre o aquecimento global.



Os combustíveis não renováveis podem causar poluição em lagos, rios, mares e principalmente no ar. Para cada 3,8 litros em média de gasolina que um automóvel chega a queimar, são liberados, na atmosfera, em torno de 10 kg de CO<sub>2</sub>, elevando assim, significativamente, a poluição atmosférica, que pode desencadear um aumento do número de pessoas com graves doenças respiratórias, se tornando, também, um problema sério de saúde pública (DANNI-OLIVEIRA, 2008).

Assim, esse tipo de energia está chegando ao seu esgotamento, por sua impossibilidade de renovação natural, por sua alta capacidade poluente, pelo caráter não sustentável e também pelos aumentos consecutivos do seu preço comercial, motivando assim um maior interesse mundial por recursos provenientes da energia renovável (OPENSHAW, 2000; VERRASTRO; LADISLAW, 2007).

Logo, considerando os diversos malefícios consequentes do combustível fóssil, a biomassa, como uma fonte de energia renovável, se torna fundamental e inquestionável para o desenvolvimento de uma civilização, de forma sustentável (DIVAKARA et al., 2009).

Em vista do interesse e da necessidade crescente por energia renovável, os biocombustíveis, que são todos e quaisquer tipos de combustíveis produzidos a partir da biomassa, se tornam uma das melhores opções para a redução da emissão de gases que poluem o ar atmosférico e provocam o efeito estufa (FAIRLESS, 2007).

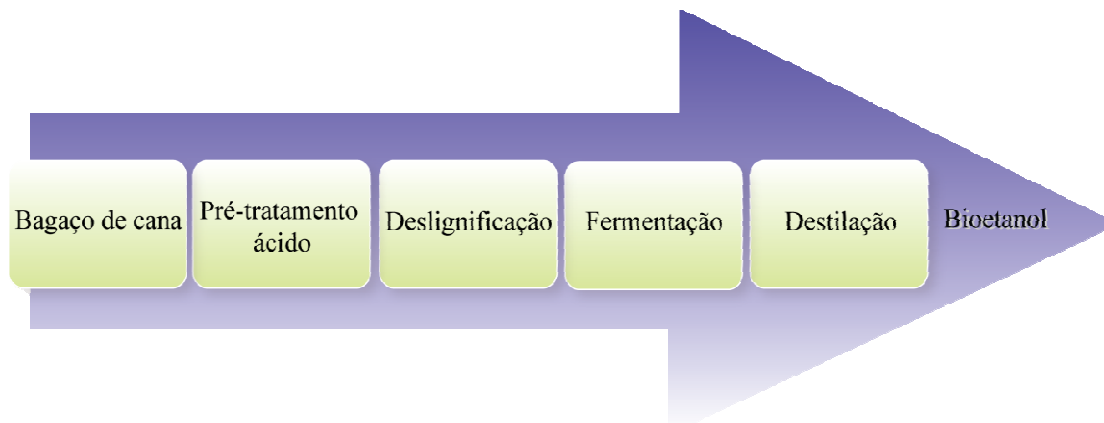
Os biocombustíveis são renováveis e podem ser utilizados, puros ou misturados, com combustíveis convencionais, em diversos percentuais. Na metade dos anos 70 obtiveram destaque, através do etanol, proveniente principalmente da cana de açúcar, no Brasil, e do milho, nos EUA. Mas a soja, trigo e beterraba também são fontes importantes de matéria-prima. Em seguida, na década de 90, veio o biodiesel, gerado de plantas oleaginosas convencionais como a soja, mamona, girassol, algodão e a palma, sendo todos chamados de biocombustíveis de primeira geração (ESCOBAR et al., 2009).

Na atualidade está se desenvolvendo uma segunda geração de biocombustíveis; representada pelo etanol de lignocelulose (também chamado bioetanol), gerados de resíduos vegetais agroindustriais, processados, como é o caso do bagaço da cana de açúcar (Figura 1.3), e pelo biodiesel proveniente de potenciais plantas oleaginosas alternativas, como o pinhão manso (*Jatropha curcas*) (CONTRAN et al., 2013; PARAWIRA, 2010).

A produção comercial de biocombustível de segunda geração poderá trazer resultados mais significativos para a proteção do meio ambiente e a segurança alimentar, pois, bem diferente do de primeira geração, não competirá com a produção de alimentos (WIEBE et al., 2008). Haja vista que a matéria prima é proveniente dos resíduos agrícolas e

de óleos vegetais de oleaginosas não utilizadas na alimentação, como a *Jatropha curcas* (TIWARI et al., 2007). Essas novas fontes de bioenergia constituem, hodiernamente, a melhor maneira de se produzir bioetanol e biodiesel considerado “mais limpo” e necessário para suprir uma demanda mundial por energia sustentável, como é requerida pelo setor de transportes (NAIK et al., 2010).

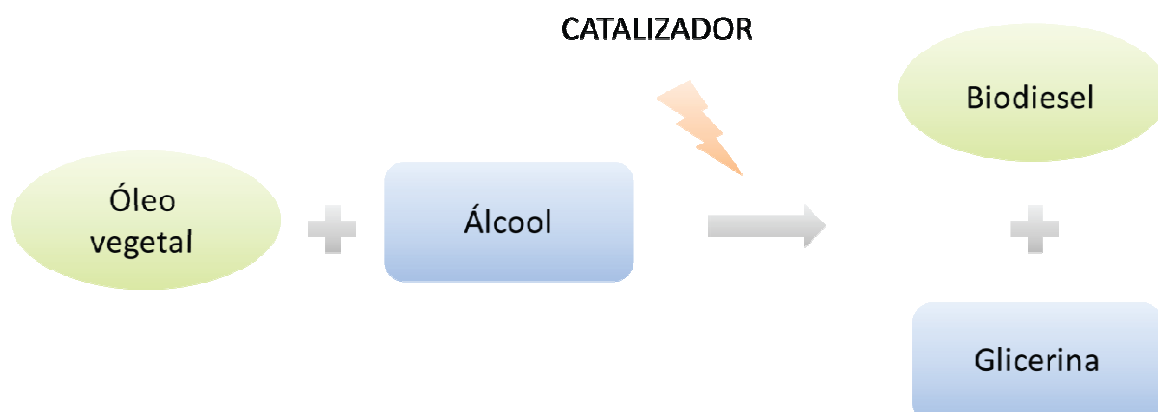
**Figura 1.3.** Esquema simplificado do processo de fabricação do bioetanol.



## 1.2. O biodiesel como fonte de energia veicular limpa

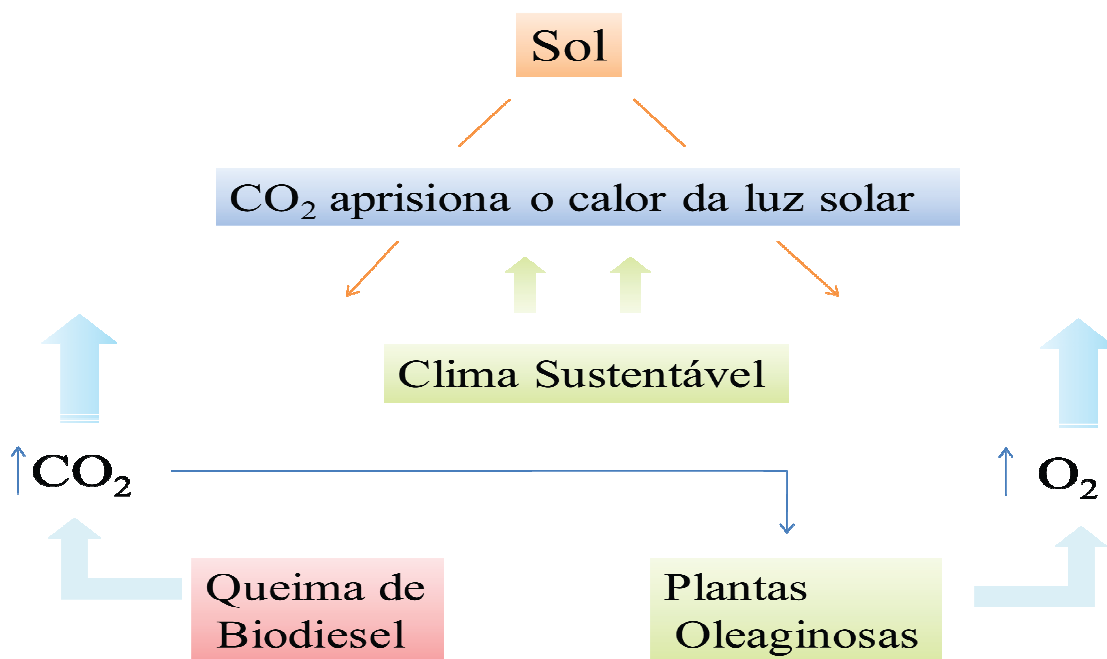
O biodiesel é um “combustível limpo” e renovável, substituto natural do diesel convencional (fóssil), que pode ser obtido de óleos vegetais não-comestíveis, óleos comestíveis utilizados em frituras e de gordura animal (GERPEN, 2005). É um éster de ácidos graxos resultante de uma reação entre um triglicerídeo e um álcool, reação esta chamada de transesterificação (Figura 1.4), que torna o óleo vegetal compatível com os motores a diesel (SCHUCHARDT et al., 1998).

**Figura 1.4.** Esquema simplificado do processo de transesterificação.



Após a reação, ocorrida através de um catalizador, é obtido um óleo com grande poder calorífico, menos viscoso que o óleo vegetal *in natura*, com características bem semelhantes ao diesel de origem mineral, o que faz do biodiesel uma ótima alternativa a ser utilizada em motores do tipo ciclo diesel, sem nenhuma alteração no seu funcionamento (CASTELLANELLI et al., 2008). É menos poluente, pois não contém enxofre na composição e reduz o risco de aquecimento global por possuir um ciclo fechado de carbono (Figura 1.5).

**Figura 1.5.** Esquema do uso sustentável do biodiesel.



Pode ser utilizado puro (B100; 100% de biodiesel) ou misturado ao óleo diesel mineral em qualquer proporção (B2; 2% de biodiesel, B5; 5% de biodiesel, B20; 20% de biodiesel). Sua utilização se tornou frequente, a partir de 1991, na Europa, passando em 1992 a ser produzido em larga escala. Em 2003 a União Européia, por meio de vários subsídios, estimulou bastante o mercado de biodiesel (BRASIL, 2003).

Na Alemanha, maior produtor, em 2003, já eram praticados preços menores para o biodiesel em relação ao diesel mineral, isso porque havia uma completa isenção dos tributos em toda cadeia produtiva do biodiesel, viabilizando assim o uso do mesmo, inclusive, totalmente puro. Nesse país, o consumidor ainda pode usar o B100 direto na bomba, ou fazer misturas com o diesel mineral em proporções diversas. Atualmente já existe uma frota significativa de veículos leves, coletivos e de cargas utilizando o B100 (BRASIL, 2003).

No mundo, a produção de biodiesel, derivada de óleos vegetais, durante os anos de 2004 e 2005 foi estimada em aproximadamente 2,4 milhões de toneladas. Em 2006 já era de 4,1 milhões de toneladas e a estimativa para 2017 é que alcance um total de 24 bilhões de litros (DIVAKARA et al., 2009).

A Alemanha e o Brasil são, respectivamente, os países maiores produtores. Estimulados pela crescente demanda do setor de transportes por um combustível sustentável, necessitam do estabelecimento de diretrizes políticas de produção, de investimentos em desenvolvimento tecnológico e de pesquisas por cultivares que se tornem matérias-primas mais viáveis para a produção de biodiesel (YUSUF; HANNA, 1995).

Vale ressaltar que toda e qualquer diretriz a ser desenvolvida por uma nação, com respeito a sua matriz energética, deve contemplar, além das políticas econômicas e ambientais, citadas anteriormente, a política de inclusão social e da oferta de emprego (MINISTÉRIO DESENVOLVIMENTO AGRÁRIO, 2012).

O Brasil é um país com um invejável potencial para produção de energia renovável. Sua geografia oferece grandes vantagens por se situar em uma região tropical, com altas taxas de luminosidade, temperaturas médias por todo o ano, boa disponibilidade hídrica e com chuvas regulares. No entanto, mesmo possuindo a maior área agricultável do mundo e uma matriz energética com expressiva participação de energias renováveis, explora menos de um terço dessa área, deixando ociosa uma área em potencial maior que 140 milhões de hectares (BRASIL, 2005).

Em toda essa área agricultável é possível explorar uma grande diversidade de opções para produção de biodiesel, tais como a palma e o babaçu no norte, a soja, o girassol e o amendoim nas regiões sul, sudeste e centro-oeste, a mamona no nordeste, e o pinhão manso que se apresenta como a mais nova alternativa para as diversas regiões do país, principalmente para o semi-árido nordestino (BRASIL, 2005).

### **1.3. O Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel (PNPB)**

Criado em 2004 pela Lei nº 11.097 de 13 de janeiro de 2005, como fruto de estudos para a inclusão do biodiesel na matriz energética brasileira, o Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel (PNPB) é um programa interministerial do Governo Federal do Brasil que objetiva a implementação, de forma sustentável, da produção e uso do Biodiesel, com enfoque na inclusão social e no desenvolvimento regional, gerando emprego, renda e desenvolvimento para a região (MINISTÉRIO DESENVOLVIMENTO AGRÁRIO, 2012).

O PNPB estabelece condições especiais aos produtores de biodiesel que recebem o “Selo de Combustível Social”, ofertado pelo Ministério do Desenvolvimento Agrário (MDA), para aqueles que introduzem a agricultura familiar na cadeia de produção da matéria-prima. Desta forma o produtor promove inclusão social e, conseqüentemente, desenvolvimento regional (MINISTÉRIO DESENVOLVIMENTO AGRÁRIO, 2012).

O Programa é pautado em um modelo de agricultura sustentável, através da produção de biodiesel com alto padrão de qualidade, a partir de diferentes fontes oleaginosas, nas diversas regiões do país, garantindo o suprimento da demanda através de preços competitivos frente ao diesel de petróleo. Tudo isso com um sentimento verdadeiro de promover inclusão social (MINISTÉRIO DESENVOLVIMENTO AGRÁRIO, 2012).

#### **1.4. *Jatropha curcas* L. como a “planta do biodiesel”**

Dentre as diversas fontes de plantas oleaginosas, o pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) apresenta-se como uma das mais promissoras fontes para a produção de biodiesel no Brasil (Figura 1.6).

**Figura 1.6.** Pinhão Manso (*Jatropha curcas* L.). Fonte: Raposo 2013.





Estudos de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação em Pinhão Manso para a produção de biodiesel, através do projeto do governo brasileiro, BRJATROPHA, estão sendo desenvolvidos visando dar suporte técnico-científico ao cultivo do pinhão manso e à valoração dos resíduos da sua cadeia de produção (DURÕES et al., 2009).

O pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) é considerado como uma das principais alternativas de interesse para atender à demanda de óleo vegetal a ser usado na produção de biodiesel e bioquerosene, tanto para o mundo, quanto, mais especificamente, o Brasil (MOHIBBE et al., 2005; KATEMBO; GRAY, 2007).

A *Jatropha curcas* L. é um arbusto oleaginoso, perene, que mede em torno de 3 metros, podendo, em condições favoráveis, crescer até 6 m (HELLER, 1996). Pertence a mesma família da mamona, Euphorbiaceae, e tem uma longevidade que pode chegar até 5 décadas. Seus frutos, em cachos, são arredondados e verdes quando jovens (Figura 1.7A). Ao ficarem maduros, possuem uma coloração amarelada que vai progredindo para marron-escuro a preto (KUMAR; SHARMA, 2008), após atingirem a maturação plena (Figura 1.7B).

**Figura 1.7** A) Frutos jovens de Pinhão Manso B) Frutos maduros de Pinhão Manso. Fonte: Raposo 2013.

A) Frutos jovens

B) frutos maduros



Suas sementes chegam a fornecer de 27 a 38% de óleo vegetal e são consideradas tóxicas, devido à presença de curcina e, principalmente, de ésteres de forbol (MAKKAR et al., 1997; LAVIOLA et al., 2010; ISLAM et al., 2012). Estudos têm sido feitos para a destoxificação da torta do pinhão manso, para que a mesma possa ser bem aproveitada na alimentação de ruminantes (AREGHEORE et al., 2003).

Sua rusticidade e fácil adaptabilidade, a temperaturas elevadas e a solos pobres e erodidos, faz da *Jatropha curcas* L. uma planta oleaginosa promissora para o desenvolvimento de plantações comerciais no semiárido nordestino e outras regiões climaticamente adversas, como o norte do Brasil. Essa oleaginosa possui bom rendimento e qualidade de óleo favorável à produção de biocombustíveis, adaptabilidade às diferentes regiões de cultivo, longa produtividade e constitui-se em ótima alternativa para diversificação (SURWENSHI et al., 2011).

Apesar de seu potencial, a espécie está em fase de domesticação, não existindo, ainda, cultivares e sistema de produção validado para as diferentes regiões produtoras de biodiesel. Para tanto, ações técnico-científicas e investimento público e privado têm focado na pesquisa, no desenvolvimento e na conservação do material genético da *Jatropha curcas*, através da criação de banco de germoplasma (BAG) (figura 1.8), para estudos de melhoramento da planta.

**Figura 1.8.** Banco Ativo de Germoplasma (BAG) de Pinhão Manso da Embrapa Cerrados-DF. Fonte: Raposo 2013.



### 1.4.1 Classificação botânica

Reino: Plantae

Subreino: Tracheobionta

Divisão: Embryophyta

Classe: Magnoliopsida

Subclasse: Rosidae

Ordem: Malpighiales

Família: Euphorbiaceae

Subfamília: Crotonoideae

Tribo: Jatrophaeae

Gênero: *Jatropha*

Espécie: *Jatropha curcas* L.

### 1.4.2 Sinônimos e nomes comuns

Por possuir uma ampla distribuição em várias partes do mundo, a *Jatropha curcas* pode ser identificada através de diferentes nomes, a saber: no Brasil é conhecida como pinhão manso e outros nomes populares como “pião”, pinhão “bravo”, pinhão “do Paraguai”, pinhão “do inferno”, pinhão “de cerca”, pinhão “das barbadás”, purgueira, grão de maluco (PEIXOTO, 1973). Em Cuba é chamada de piñon botija, piñon purgante, piñon de cercas (BISSE, 1988). No México é chamada piñoncillo. No Peru chama-se piñol. Na Costa Rica e na Nicarágua é tempate. Na Espanha é conhecida como coquillo. É piñon na Guatemala, e nos países de língua inglesa é chamada de “physic nut” (TORRES et al., 2007).

### 1.4.3 Uma planta com “finalidades múltiplas”

Derivado do grego, *iatros* que significa “médico”, “medicinal”, e *trophe* que significa “alimento”, a palavra *Jatropha*, estruturalmente, representa as implicações medicinais que a planta possui. A *Jatropha curcas*, que hoje é uma das fontes mais promissoras para a produção de biodiesel, já era bem conhecida no passado por seus fins medicinais e por várias outras finalidades. Suas funções vão desde a sua utilização para fabricação caseira de sabão (ISLAM et al., 2011), uso como cercas vivas (YE et al., 2009), controle de erosão (BEHERA et al., 2010), recuperação de áreas degradadas, fertilizante,

alimentação animal (MAKKAR et al., 2008), até ao uso para tratamento de diversas doenças, e mais recentemente, fornecimento de óleo para a produção comercial de biocombustível (FAIRLESS, 2007; TORAL et al., 2008).

#### **1.4.3.1 Características medicinais**

Todas as partes da planta têm usos medicinais. Diferentes partes da *Jatropha curcas* L. são utilizadas para os mais variados fins medicinais. Os frutos têm atividade contraceptiva (GOONASEKERA et al., 1995). O óleo extraído das sementes é usado para o tratamento de eczemas e doenças de pele, como também para dores reumáticas (MARROQUIN et al., 1997). O látex inibe o vírus do mosaico da melancia e possui atividade cicatrizante (TEWARI; SHUKLA, 1982). Os galhos finos tratam gengivites e hemorragias gengivais (SIREGAR; AKBAR, 2007). O extrato da planta é usado para o tratamento de alergias, queimaduras, cortes, ferimentos inflamados (SHARMA et al., 2012).

#### **1.4.3.2 Outras finalidades**

A *Jatropha curcas* L. também pode ser bem aproveitada como cercas vivas, pois libera um látex cáustico que “repele” os animais. Mas, para fins medicinais, o mesmo látex passa a ter função cicatrizante, como também, hemostática (THOMAS et al., 2008). A torta de pinhão manso é um excelente fertilizante do solo. As variedades não tóxicas servem como alimentação animal, em média fornecendo 54% de proteína. Para solos degradados, a planta, por ser perene, tem a capacidade de promover boa deposição de matéria seca e assim reduz a erosão e a perda de água por evaporação (SACHS, 2007).

Apesar da ampla utilização da *Jatropha curcas* ainda não se sabe acuradamente sobre seu centro de origem.

### **1.5 Centro de origem e diversidade**

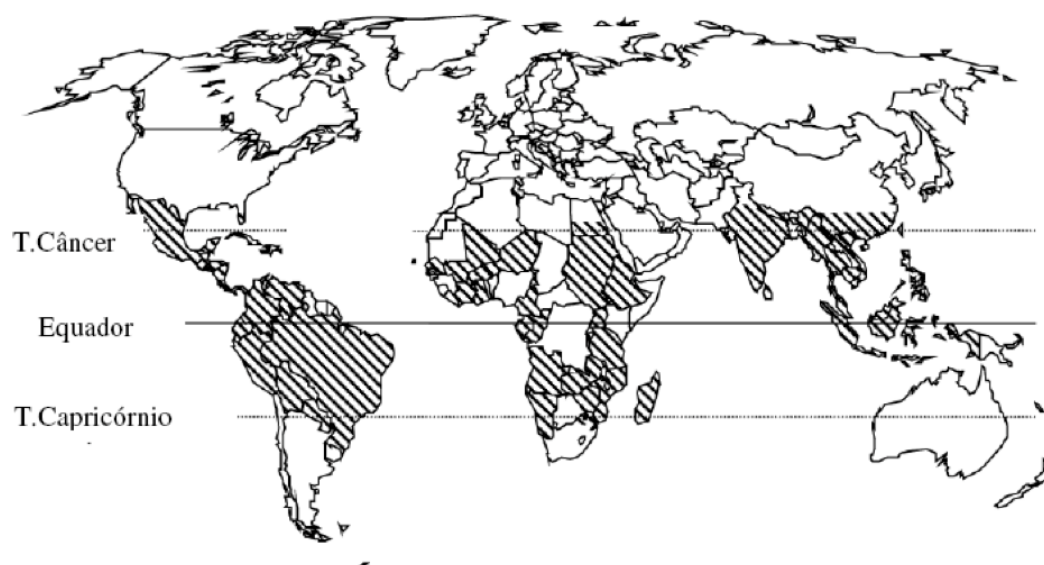
Esse é um ponto onde não se tem unanimidade entre os mais diversos autores. Até porque para alguns estudiosos “um centro de diversidade não necessariamente é um centro de origem” (OVANDO-MEDINA et al., 2011), diferentemente do que tinha proposto Vavilov (1926) ao afirmar que são nos centros de origem que ocorre a maior diversidade genética das espécies.

Segundo Heller (1996) e Parawira (2010), é muito provável que o lugar de origem da *Jatropha curcas* L. seja o México e outros países da América Central como a Guatemala, Honduras, Nicarágua e República Dominicana.

Segundo Basha et al. (2009), a planta é nativa provavelmente da América Central e amplamente presente em toda a América Central, África e Ásia. Já para Openshaw (2000), Arruda et al. (2004) e Bomfim-Góis et al. (2006), o centro de origem da *Jatropha curcas* é a América do Sul, mais especificamente o Brasil. Melo et al. (2006) concorda com essa idéia e inclusive sugere o estabelecimento de culturas extensivas da *J. curcas* na América do Sul por ser “uma espécie nativa do Brasil”. Nesta mesma linha de pensamento, Martin & Mayeux (1984) foram mais específicos e afirmaram que o estado do Ceará era o centro de origem. Alguns outros autores se limitam a afirmar que a planta se originou da América tropical (RANADE et al., 2008; AMBROSI et al., 2010).

Atualmente o pinhão manso é encontrado em quase todas as regiões tropicais e intertropicais, incluindo países da América Central, América do Sul, África, sudeste Asiático e Índia (Figura 1.9). No entanto, não se tem certeza do seu verdadeiro centro de origem e por isso estudos do genoma, através de amostras de *Jatropha curcas* L. de diferentes procedências do mundo, estão sendo desenvolvidos por vários centros de pesquisas, como a Universidade de Wageningen, na Holanda (JONGSCHAAP, 2007), a Embrapa Algodão (SILVA et al., 2008) e a Embrapa Agroenergia (ROSADO et al., 2010) no Brasil.

**Figura 1.9.** Distribuição de *Jatropha curcas* e possíveis centros de diversidade (vermelho) – adaptado Heller (1996); King et al. (2009).



## 1.6 Importância da diversidade genética

Nosso planeta é povoado por uma grande variedade de espécies distribuídas por todos os continentes. A isso se dá o nome de biodiversidade e a conservação e utilização dos seus recursos genéticos é de enorme importância estratégica para a humanidade.

Atualmente, as regiões da América Central e do Sul são consideradas como os centros de maior diversidade biológica do mundo (também chamadas regiões de megabiodiversidade), e muitas espécies de plantas de importância agrícola, farmacológica e medicinal são provenientes destes centros, inclusive a *Jatropha curcas* L. (AMBROSI et al., 2010).

O processo evolutivo de uma espécie vegetal perpassa por pequenas variações ocorridas no genoma dos indivíduos de uma determinada população, ao longo das gerações. Essas “variações” que podemos chamar de variabilidade genética, são geradas, fundamentalmente, por mutações, recombinações e o próprio fluxo gênico entre as plantas (BRAMMER, 2002).

Existe uma ampla variabilidade genética disponível nas espécies vegetais, dentro das populações e entre elas, e cada espécie pode apresentar milhares de variantes (ALLARD, 1970).

As diferentes espécies vegetais estão submetidas a uma ativa interação com o meio ambiente que em contra partida faz gerar um grande número de genótipos adaptados às diferentes condições locais, ampliando assim a diversidade genética (BRAMMER, 2002).

A intensa intervenção humana, motivada por demandas de mercado, o aumento de solos degradados e a diminuição dos solos cultivados tem afetado negativamente a diversidade genética de cultivares de interesse comercial.

O conhecimento da diversidade genética entre os vários grupos de progenitores torna-se de fundamental importância para os programas de melhoramento genético em plantas (BRAMMER, 2002).

Diversos aspectos da biologia da *Jatropha curcas* estão sendo estudados ao redor do mundo, incluindo sua diversidade genética (SINGH et al., 2010; DIAS et al., 2012; XU et al., 2012). Através desses estudos, a identificação de genótipos elites está contribuindo no melhoramento do pinhão manso para fins de produção de biocombustíveis.

Cultivares com alta produtividade de grãos e teor de óleo, sem constituintes tóxicos (como a curcina e os ésteres de forbol), resistentes a estresses bióticos e abióticos,

adaptados as mais diversas regiões do Brasil, principalmente o semi-árido, estão sendo desenvolvidos (ROSADO et al., 2010).

## **1.7 Uso de marcadores genéticos no estudo da diversidade genética da *Jatropha curcas* L.**

Conhecer a diversidade genética de uma determinada espécie (principalmente quando destinada a fins comerciais) é um atributo *sine qua non* para o melhorista.

A utilização de técnicas para a identificação e diferenciação de indivíduos da mesma espécie de uma população, e entre populações, é um passo importante para os programas de melhoramento, pois só através delas é possível a identificação e seleção de genótipos superiores.

O uso de marcadores genéticos em cultivares de *Jatropha curcas* possibilita a genotipagem de acessos naturais de qualquer parte do mundo como também de bancos de germoplasma que geralmente possuem coleções oriundas de vários centros de diversidade e de possíveis centros de origem (ROSADO et al., 2010).

Os principais marcadores utilizados para o melhoramento de plantas são os morfológicos (SILVA et al., 2008; LAVIOLA et al., 2010; PINILLA et al., 2011) e, mais atualmente, os moleculares (ROSADO et al., 2010; SINGH et al., 2010; XU et al., 2012; ALKIMIM et al., 2013).

### **1.7.1 Uso de marcadores genético-morfológicos**

Os marcadores morfológicos variam para cada espécie estudada e surgem da observação de aspectos morfológicos e fenológicos da planta, gerando as chamadas “listas de descritores”, permitindo assim a diferenciação fenotípica dos acessos coletados e a seleção dos desejáveis para o melhoramento genético (LAVIOLA et al., 2010).

Na Colombia, usando 27 descritores morfoagronômicos para 246 acessos de *Jatropha curcas* L., pertencentes ao centro de investigação “La Libertad” foi encontrada variabilidade genética entre os acessos pesquisados, em especial, os descritores referentes à arquitetura da planta, porte das plantas, cor do látex (PINILLA et al., 2011).

Silva et al. (2008) avaliaram 103 acessos pertencentes ao banco de germoplasma do campo experimental da Embrapa em Patos-PB, considerando os seguintes descritores morfológicos para *Jatropha curcas* L.: altura da planta, diâmetro do caule, número de ramos,

entrenós, inflorescências e flores, de acessos de diversas regiões do Brasil (Ceará, Paraíba, Pernambuco, Tocantins) e do mundo (El Salvador, Colômbia e África). Constataram existência de acentuada variabilidade genética entre as plantas que foram avaliadas, o que vem ratificar a necessidade de uma caracterização de indivíduos de diferentes procedências a fim de se determinar a diversidade genética disponível.

Laviola et al. (2010), utilizaram descritores morfoagronômicos para a caracterização fenotípica de 175 acessos de *Jatropha curcas* L. pertencentes ao banco de germoplasma da Embrapa Cerrados-DF, constituído de acessos de diferentes locais, coleções e plantios do Brasil e verificaram a existência de variabilidade genética para os caracteres avaliados: produção de grãos (Prod. Grãos), número de ramos secundários por planta (NRS), altura de plantas (Altura, m), diâmetro de caule (DC, mm), projeção da copa na linha (PC – linha, m), projeção da copa na entrelinha (PC – entre, m), juvenilidade (Juv, dias) e altura da primeira inflorescência (API). No entanto, em outro estudo, como colaborador, utilizando marcadores moleculares, os resultados constataram uma variabilidade genética baixa, demonstrando uma provável ancestralidade comum dos acessos de pinhão manso introduzidos no Brasil (ROSADO et al., 2010). Os acessos utilizados (192) foram os mesmos estudados anteriormente através de marcadores morfoagronômicos (175), incluídos mais 17 novos acessos.

É importante considerar a existência de limitações funcionais dos descritores morfoagronômicos, onde nem sempre será possível distinguir, de forma acurada, caracteres de cultivares comerciais, principalmente aqueles de estreita base genética, pois marcadores morfológicos variam sob influência das condições ambientais (SMITH; SMITH, 1992).

### **1.7.2 Uso de marcadores genético-moleculares**

Historicamente, os estudos relacionados com diversidade genética em plantas eram desenvolvidos, fundamentalmente, através de dados botânicos e morfológicos. A caracterização do germoplasma era baseada em características de herdabilidade alta e baixa, medidas através do fenótipo. No entanto, as principais limitações desse tipo de caracterização são a influência ambiental, o longo tempo para coleta de dados e o reduzido número de genes envolvidos no processo.

Com a chegada de novas tecnologias da biologia molecular, como da tecnologia do DNA recombinante, PCR (reação em cadeia da polimerase) e dos sequenciadores



automáticos de DNA, poderosos marcadores moleculares foram desenvolvidos (GUPTA et al., 1999).

Os marcadores moleculares apresentam uma série de vantagens em relação aos morfoagronômicos, mas a principal de todas é de possuírem a capacidade de analisar, diretamente do DNA, o genoma de uma planta e assim gerarem uma grande quantidade de informações sobre sua identidade genética e sua diversidade, sem influências do ambiente (PAMIDIMARRI et al., 2009).

Existem dois grupos de marcadores moleculares: enzimáticos e o de DNA. Cada grupo possui vantagens e desvantagens para o seu uso, sendo fundamental, num programa de melhoramento, escolher aquele que forneça mais informações úteis possíveis, dentro das condições reais de infra-estrutura e da relação custo-benefício para se alcançar o objetivo proposto (PATERSON et al., 1991).

### **1.7.2.1 Marcadores enzimáticos**

#### **1.7.2.1.1 Isoenzimas**

Desenvolvidos na década de 60 como marcadores enzimáticos, as chamadas “isoenzimas”, que são enzimas de diferentes formas moleculares e possuem afinidade pelo mesmo substrato, ganharam grande conotação científica, nos anos 70, como marcadores superiores aos tradicionais marcadores morfológicos (SCANDALIOS, 1969).

Suas vantagens vão desde a simplicidade, rapidez, baixo custo e fácil metodologia até seu caráter co-dominante (TORRES et al., 1978).

A técnica consiste, basicamente, no uso de eletroforese em gel de amido ou poliacrilamida e na visualização do produto enzimático por métodos histoquímicos. As isoenzimas se apresentam, no campo elétrico, com diferenças na mobilidade, resultante de diferenças nas sequências de DNA que codificam tais enzimas (KEPHART, 1990).

Em *Jatropha curcas*, a técnica foi utilizada por Bomfim-Góis et al. (2006) no estudo de 15 acessos provenientes de diversos estados brasileiros (Espírito Santo, Goiás, Minas Gerais e Sergipe) para estimar a existência de similaridade genética entre os genótipos através da expressão da peroxidase (PO), da esterase (EST), e da glutamato oxalacetato transaminase (GOT). Eles observaram diferenças nos perfis eletroforéticos dos acessos para os diferentes sistemas enzimáticos, mas de forma bem moderada. No entanto, um genótipo denominado no estudo por JCUFLA001, proveniente de Minas Gerais, foi considerado o mais

divergente, com aproximadamente 55% de similaridade do restante do material biológico testado.

Na Índia, 55 acessos de *Jatropha curcas* provenientes de Jammu e Jodhpur foram avaliados utilizando isoenzimas como marcadores. Quinze sistemas enzimáticos foram usados e se verificou a sua eficácia em distinguir os acessos. Do total, doze não exibiram qualquer variação. O nível baixo de variação genética entre os diferentes acessos sugere uma pobre segregação dos genes ao longo das gerações (WARRIER et al., 2010).

Apesar de serem muito úteis em estudos para medir os níveis de variabilidade genética entre indivíduos de uma determinada população, como também entre populações (PAREDES; GEPTS, 1995), as isoenzimas apresentam como desvantagens; um nível baixo de polimorfismos, principalmente quando a base genética é estreita, e influências dos fatores ambientais nas atividades enzimáticas, uma vez que as proteínas são produtos de DNA e podem ser afetadas qualitativamente e quantitativamente em seus níveis de expressão (MAY, 1992). Logo, o reduzido número de sistemas enzimáticos polimórficos impõe limitações variáveis ao sucesso da técnica, principalmente em relação a cultivares comercial.

### **1.7.2.2 Marcadores de DNA**

#### **1.7.2.2.1 Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)**

Desenvolvidos por Botstein et al. (1980), os polimorfismos de comprimento de fragmentos de restrição ou simplesmente polimorfismos de tamanho de fragmento, são sequências de DNA, de vários tamanhos, originadas da ação de uma enzima de restrição (ER) que “corta” a fita de DNA no chamado “sítio de reconhecimento” da ER, gerando fragmentos de tamanhos variados que são separados através de eletroforese em gel de agarose.

As variações de tamanho dos fragmentos ocorrem devido à “variações” nas sequências de nucleotídeos, exatamente nos sítios de reconhecimento da ER, por mutações, deleções, inserções que impedem o “reconhecimento” e conseqüente “corte” da fita de DNA no sítio de restrição. Os fragmentos de tamanhos diferentes são separados através de eletroforese em gel de agarose e, posteriormente, são feitas autoradiografias para visualização das bandas no gel.

Comparados com os marcadores enzimáticos, os RFLPs detectam, com maior eficiência, mudanças genéticas pontuais (inclui exons e introns) e possuem alta reprodutibilidade.

Os marcadores RFLP são co-dominantes, sendo utilizados em análise filogenética, *fingerprinting*, diversidade genética e em mapeamento genético (BECERRA; GEPTS, 1994). No entanto, apresentam como desvantagens a exigência de se ter um DNA de boa qualidade e em grande quantidade.

Como foram desenvolvidos no início da década de 80, tiveram utilidade no estudo de cultivares comerciais tais como a soja (YU et al., 1996) e o arroz (HITTALMANI et al., 2000). Porém, o elevado custo e o tempo necessário para a obtenção desses marcadores restringem severamente o seu uso, assim como também o surgimento de marcadores mais práticos baseados na amplificação do DNA.

#### **1.7.2.2.2 *Random Amplified Polimorphic DNA (RAPD)***

Desenvolvidos por Williams et al. (1990), os fragmentos polimórficos de DNA amplificados ao acaso são utilizados em estudos de caracterização da variabilidade genética em várias espécies de interesse econômico.

Para o uso desta técnica faz-se necessário o emprego de uma tecnologia, desenvolvida na metade da década de 80, conhecida por *Polymerase Chain Reaction (PCR)* que se baseia na amplificação enzimática de um fragmento de DNA flanqueado por dois iniciadores de natureza oligonucleotídica (também chamados de *primers*) hibridizados em fitas de DNA opostas (sempre no sentido 5' - 3'). O fragmento de DNA alvo é amplificado por ciclos repetidos de desnaturação – anelamento dos primers – extensão/polimerização do DNA através de um termociclador (HEID et al., 1996).

Os *primers* utilizados em análises de RAPD possuem frequentemente 10 bases (nucleotídeos) de sequencia aleatória, e por serem aleatórios a sequência alvo da amplificação é desconhecida. Os produtos são submetidos à eletroforese em gel de agarose ou poliacrilamida e os resultados são fotodocumentados sob luz ultravioleta (MARTIN et al., 1995).

As principais vantagens da técnica são a utilização de pequenas quantidades de DNA como molde (*template*), o baixo custo, a facilidade e a rapidez para obtenção dos resultados (DESHWALL et al., 2005).

Em *Jatropha curcas* muitos estudos já foram realizados tendo por base marcadores RAPD. Por exemplo, 42 acessos provenientes da Índia e do México foram analisados por RAPD onde resultou em 42% de polimorfismos, representando uma diversidade genética de baixa a moderada (BASHA; SUJATHA, 2007). Resultados

semelhantes foram encontrados no estudo de 28 acessos provenientes do leste Indiano (SINGH et al., 2010).

Rosado et al. (2010), utilizaram 96 primers RAPD, que amplificaram 381 locos sendo apenas 23 polimórficos, 6% de locos polimórficos. Mais importante foi que, diante dos resultados, concluíram existir uma estreita base genética entre os acessos coletados em diferentes regiões geográficas do Brasil (Bahia, Distrito Federal, Minas Gerais, Pará, Paraná, Pernambuco, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Goiás, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, São Paulo).

Estudos feitos com 46 acessos de *Jatropha curcas* do banco ativo de germoplasma (BAG) da Companhia de Pesquisa Agrônômica do estado de Minas Gerais (EPAMIG/URNM), utilizando 33 primers RAPD, obtiveram como resultados 24 locus polimórficos, concluindo que devido a uma baixa diversidade genética é necessário ampliar a base genética e incluir novos acessos ao BAG para aumentar a variabilidade da *J. curcas* (ALKIMIM et al., 2013).

Khurana-Kaul et al. (2012), analisaram 29 acessos de *J. curcas* de diferentes localizações em Rajasthan, na Índia, e obtiveram um índice de polimorfismos superior a 50%, ao contrário da baixa diversidade genética, já relatada anteriormente, encontrada por Basha e Sujatha (2007), Singh et al. (2010), Rosado et al. (2010) e Alkimim et al. (2013), que provavelmente tenha ocorrido por existir uma ancestralidade comum devido a possibilidade de acessos duplicados nas coleções de germoplasma.

Apesar de marcadores RAPDs possuírem habilidade para detectar regiões de DNA altamente variáveis (5-10 loci por *primer*), apresentam possíveis desvantagens: são marcadores dominantes, ou seja, não diferenciam o loci heterozigoto do loci homozigoto; diferentes condições laboratoriais, quando da amplificação, podem dar origem a diferentes resultados, ou seja, podem apresentar baixa reprodutibilidade (BECERRA; PAREDES, 2000).

#### **1.7.2.2.3 Amplified Fragment Length Polymorphic (AFLP)**

Desenvolvidos na década de 90, os polimorfismos de comprimento de fragmentos amplificados é um tipo de marcador que surgiu da combinação de estratégias do RFLP (uso de enzimas de restrição) e do RAPD (uso da PCR para obtenção de fragmentos amplificados) (VOS et al., 1995).

Os AFLPs são pequenos fragmentos de DNA medindo entre 80 a 500 pb. São obtidos pela digestão do DNA, de ótima qualidade, por enzimas de restrição e que

posteriormente são ligados a adaptadores (oligonucleotídeos complementares) e amplificados por PCR. Os produtos (fragmentos) da amplificação são visualizados, em forma de bandas, por auto-radiografia ou coloração por nitrato de prata, após eletroforese em gel de agarose ou poliacrilamida (VOS et al., 1995).

A técnica possui como vantagens principais uma maior eficiência na detecção de polimorfismos que os métodos RFLP e RAPD. Os AFLPs detectaram, em estudos com a soja (*Glycine Max*), em torno de 12 vezes mais *loci* polimórficos comparados com os RAPDs (VOGUEL et al., 1994).

Em *J. curcas* marcadores AFLPs foram usados para determinar a diversidade genética entre 38 populações, uma oriunda da Indonésia e 37 outras populações provenientes da China. De 246 fragmentos amplificados, 72 eram polimórficos, representando 27% de polimorfismo aproximadamente. O coeficiente de similaridade Jaccard mostrou uma alta taxa de similaridade (0.866 a 0.977), sugerindo uma baixa diversidade genética entre as 38 populações (SHEN et al. 2010).

Zhang et al. (2011), usando marcadores AFLPs, identificaram uma baixa diversidade genética em 240 acessos de diferentes regiões do sudeste asiático e da China. Esses achados concordam com os encontrados por Sun et al. (2008) com populações de *Jatropha curcas* da China.

Porém, Sinha e Tripathi (2013), em estudos recentes com marcadores AFLPs para a análise da diversidade genética entre 06 espécies de *Jatropha* (*J. curcas*, *J. integerrima*, *J. glandulifera*, *J. podagrica*, *J. dioca* e *J. gossypifolia*) identificaram 167 fragmentos que apresentaram polimorfismo dentre 178 analisados.

Apesar dos marcadores AFLPs serem muito polimórficos, são marcadores dominantes como os RAPDs, o que representa uma desvantagem para este tipo de marcador.

#### **1.7.2.2.4 Inter Simple Sequence Repeats (ISSR)**

A técnica é também baseada na amplificação via PCR. Os ISSRs são fragmentos de DNA que medem em torno de 100 a 3000 pb gerados a partir de um único primer, desenvolvido em sequencias repetitivas no genoma eucarioto (ZIETKIEWICZ et al., 1994).

Como nos RAPDs o conhecimento da sequencia de DNA para o desenvolvimento do *primer* não é necessário. Uma vantagem adicional é o grande número de bandas informativas geradas por reação de PCR.

Em *Jatropha curcas*, o percentual de polimorfismo usando marcadores ISSRs para o estudo de 20 acessos do banco de germoplasma do Centro de Excelencia em Biocombustíveis na Índia, foi de 99.31% (156 foram polimórficos de um total de 157 marcadores) (VIJAYANAND et al., 2009).

Senthil Kumar et al. (2009), estudando diversidade genética entre 12 espécies de *Jatropha*, de acessos coletados de diferentes partes da Índia e do Zimbábue, através de ISSRs, verificaram um alto índice de variabilidade genética entre os genótipos estudados.

Segundo Cai et al. (2010), investigando a diversidade genética de 224 acessos de *Jatropha curcas* de diversas regiões da China, utilizando marcadores ISSR, constatou que de 169 bandas amplificadas, 127 foram polimórficas (75.15%), concluindo assim que os cultivares de *Jatropha* localizados na China tem alta diversidade genética.

Em 16 acessos da Malásia, de *Jatropha curcas*, utilizando 8 primers ISSRs, 63 bandas foram amplificadas sendo 25 delas (40%) polimórficas (NOOR CARMELLIA et al., 2012). Porém, Arolu et al. (2012), estudando 48 acessos de *Jatropha curcas* também da Malásia, testaram 10 primers ISSR e obtiveram uma variabilidade dentro da população de 94%.

Apesar dos marcadores ISSRs serem muito utilizados em estudos de diversidade genética, apresenta como principal desvantagem serem marcadores dominantes (ZIETKIEWICZ et al., 1994).

#### **1.7.2.2.5 Microssatélites ou *Simple Sequence Repeats* (SSR)**

Considerados os marcadores moleculares de maior interesse atual dos geneticistas, as sequencias simples de nucleotídeos repetidos lado a lado (em tandem), também chamados de microssatélites, são marcadores co-dominantes, multialélicos e de alta heterozigosidade. São altamente polimórficos e necessitam de pouca quantidade de DNA, pois são produtos de amplificação via PCR (GUPTA; VARSHNEY, 2000).

Os microssatélites são unidades curtas (2 a 6 pb) repetidas uma após a outra que ocorrem em grande frequência no genoma de plantas (CONDIT; HUBBELL, 1991).

Marcadores SSR (microssatélites) apresentam frequentemente altos níveis de polimorfismo inter e intra-específico, particularmente quando o número de repetições lado a lado for igual ou superior a 10 (QUELLER et al., 1993).

Estudos apontam que os microssatélites podem apresentar alta taxa de mutação, sendo a maioria caracterizada por alterações no número de unidades repetitivas. E isso se dá

pelo deslizamento da DNA polimerase (slippage) durante a replicação do DNA, gerando um aumento ou diminuição do número de repetições (KANG et al., 1995).

As sequencias de nucleotídeos que se repetem lado a lado são simples e formadas por  $n$  repetições de dois, três ou quatro nucleotídeos (di, tri ou tetra nucleotídeos) tais como (CA) $n$ , (GAC) $n$ , ou (GATA) $n$ , flanqueados por regiões do DNA altamente conservadas (HEARNE et al., 1992).

Para o uso de microssatélites como marcadores moleculares é necessário o desenvolvimento de *primers* específicos para as regiões do DNA que flanqueiam os microssatélites. Esse desenvolvimento necessita da construção de bibliotecas genômicas, seleção e sequenciamento dos clones positivos e por fim o desenho dos *primers* (KIJAS et al., 1994).

Nos últimos anos, muitos pesquisadores já têm utilizado marcadores SSRs em estudos de diversidade genética da *Jatropha curcas*, reconhecendo suas vantagens em relação a outros marcadores (Tabela 1.2).

Sun et al. (2008), testaram 17 marcadores SSRs em 58 acessos de *Jatropha curcas* de várias regiões da China, mas obtiveram um índice extremamente baixo de polimorfismo.

Ricci et al. (2012), também reportaram baixo polimorfismo ao usarem 32 marcadores SSRs em 64 acessos de *Jatropha curcas* coletados do Brasil, Cabo Verde, Cuba, Moçambique e Senegal.

Bressan et al. (2012), obtiveram um índice elevado de polimorfismo ao desenvolverem e utilizarem 9 *primers* SSR em 41 acessos de *Jatropha curcas* coletados do Brasil, México e Colombia.

**Tabela 1.2.** Principais características de marcadores moleculares utilizados em estudos de diversidade genética da *Jatropha curcas* L.

<b>Tipo de Marcador</b>	<b>Expressão gênica</b>	<b>Polimorfismo</b>	<b>Reprodutibilidade</b>
<b>Isoenzimas</b>	Co-dominante	Baixo	Alta
<b>RFLP</b>	Co-dominante	Baixo-Alto	Alta
<b>AFLP</b>	Dominante	Alto	Alta
<b>RAPD</b>	Dominante	Baixo-Alto	Baixa
<b>ISSR</b>	Dominante	Alto	Alta
<b>SSR</b>	Co-dominante	Alto	Alta

## **1.8 Considerações finais**

Não há dúvidas do potencial que a *Jatropha curcas* L. possui para se tornar “a planta do biodiesel”, mas no momento atual existem diversas restrições ao seu uso em grande escala de produção. Ainda são poucas as informações sobre sua genética e, seus aspectos agronômicos de seleção não estão bem definidos. Os acessos de pinhão manso de diferentes regiões do Brasil provavelmente possuem base genética estreita, causada possivelmente por uma ancestralidade comum (ROSADO et al., 2010). Logo, estudos referentes ao seu melhoramento genético dependem de mais bancos de germoplasma com acessos das mais diversas partes do mundo (principalmente dos prováveis centros de origem) e da caracterização molecular através de marcadores genético-moleculares que se apresentem altamente polimórficos a ponto de discriminar precisamente indivíduos de estreita base genética, tais como podem ser os marcadores microssatélites.



## 2. JUSTIFICATIVA

A produção de óleo vegetal a partir do pinhão manso para abastecer a crescente demanda por biocombustíveis representa um importante desafio para o setor produtivo nacional e demanda um grande investimento em P&D&I.

Com o estabelecimento do marco legal (Leis No. 11.097/05 e No. 11.116/05; e Resoluções ANP No. 41 e 42) criou-se inicialmente uma demanda por óleos e gorduras vegetais da ordem de 840 mil toneladas em 2007 enquanto só de biodiesel a estimativa de produção para 2017 é de 24 bilhões de litros (DIVAKARA, 2009). Assim, o futuro do biodiesel no país depende de grandes áreas plantadas com oleaginosas e essas precisam gerar alta produção de óleo por hectare, a baixos custos de produção. No entanto, a utilização do pinhão manso para produção de biodiesel depende de um programa amplo de melhoramento, a começar por atividades de pré-melhoramento, como: prospecção, implantação de bancos de germoplasma e caracterizações moleculares.

Bancos de germoplasma caracterizados molecularmente, com ampla diversidade genética são imprescindíveis para a obtenção de cultivares com maior rendimento e qualidade de óleo, tolerantes a estresses bióticos e abióticos e com outras características de interesse agrônomico e industrial.

Ao caracterizar genotipicamente (diversidade, busca de marcadores em nível de DNA, etc.) poderemos acelerar este processo de melhoramento e trazer vantagens competitivas para o Brasil na área de Ciência e Tecnologia.

Para o estabelecimento de culturas com grande potencial na produção de óleo biodiesel, aspectos como a caracterização molecular dos acessos precisam ser investigados para que se possa selecionar aqueles com aspectos agrônomicos de interesse econômico, tais como alta produtividade de sementes, resistência a pragas e doenças, resistência/tolerância à seca, e alto teor e melhoramento das propriedades químicas e físicas do óleo. Desta forma, existe uma necessidade premente de maior investimento em pesquisa que vise o aprofundamento de conhecimento a respeito dessas espécies promissoras (e.g. *Jatropha curcas*).

O conhecimento da variabilidade genética existente nas populações naturais e nos bancos de germoplasma estabelecidos no país é de fundamental importância para elucidar a biologia da espécie (BRAMMER, 2002), além de informações sobre o sistema de reprodução, diversidade e estrutura genética que são importantes para o estabelecimento de estratégias que visem à conservação da *Jatropha curcas*. Sabe-se que a chave para o sucesso de todo

programa de melhoramento genético é uma adequada variabilidade genética e a avaliação de acessos divergentes com características singulares. Assim, é muito importante o levantamento de informações quanto à diversidade das populações naturais e do germoplasma disponível para o estabelecimento de coleções com variação genética representativa da espécie. Acredita-se que o germoplasma disponível apresente baixa diversidade genética. Mais pesquisas genéticas em *Jatropha curcas* necessitam ser realizadas no intuito de termos informações quanto à base genética da espécie.

O uso da variabilidade genética existente, oriunda do germoplasma disponível ou de populações naturais, está vinculado ao estudo da extensão desta variabilidade no germoplasma disponível utilizando-se marcadores moleculares tais como microssatélites de DNA, ou SSR (Short Sequence Repeats). Microssatélites são repetições curtas de bases de DNA, tais como (CA)<sub>n</sub>, (GAC)<sub>n</sub>, ou (GATA)<sub>n</sub>, abundantes na maioria dos genomas eucarióticos. São marcadores codominantes, de natureza multialélica, e altamente polimórficos, constituindo-se numa excelente ferramenta para caracterização de relações intra-específicas (MAGGIONI; ROGERS, 2002; DINIZ et al., 2004). Estes marcadores têm sido utilizados nos estudos de diversidade e distribuição genética de diversas espécies, vegetais ou animais (MORGANTE; OLIVIERI, 1993; VARSHNEY et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2006; DINIZ et al., 2004; DINIZ et al., 2005; DINIZ et al., 2007), entre outros.

Regiões polimórficas do DNA nuclear (*nuDNA*) podem, adicionalmente, ser utilizadas como ferramentas para estudos de diversidade genética e filogenia à nível inter-específico (BALDWIN, 1992).

Desta forma, o projeto aqui descrito consiste no estudo de diferentes procedências/acessos de *Jatropha curcas*, encontradas no Brasil e no mundo, por meio de ferramentas biotecnológicas avançadas (i.e. marcadores moleculares). Este estudo de diversidade permitirá identificar a proximidade genética entre diferentes procedências e selecioná-las para uso em cruzamentos de programas de melhoramento, e assim auxiliar no desenvolvimento de cultivares superiores a médio prazo. Esse direcionamento será imprescindível para incrementar novas culturas na matriz energética nacional.

### 3. HIPÓTESES CIENTÍFICAS

Diante do exposto foram formuladas as seguintes hipóteses científicas:

- 1) O Desenvolvimento de marcadores moleculares altamente polimórficos contribui para o conhecimento da variabilidade genética da *Jatropha curcas* L. existente nas populações naturais e nos bancos de germoplasma (BAG), como o da EMBRAPA MEIO-NORTE-PI.
- 2) Por ser a Guatemala um provável centro de diversidade, os acessos deste país apresentam maior diversidade genética.

## 4. OBJETIVOS

### Objetivo Geral

Desenvolver marcadores moleculares com características altamente desejáveis para o estudo da diversidade genética da *Jatropha curcas* e para o uso no melhoramento de cultivares comerciais da espécie, essencial à competitividade brasileira na produção de biodiesel.

### Objetivos Específicos

- 1) Desenvolver marcadores microssatélites a partir do DNA nuclear de *Jatropha curcas*;
- 2) Realizar genotipagem, por meio de marcadores de DNA microssatélites, de procedências oriundas do centro de diversidade genética.

## Capítulo II

---

Isolation and characterization of new *Jatropha curcas* polymorphic markers from microsatellite double-enriched genomic libraries \*<sup>1</sup>

\*<sup>1</sup> This chapter was submitted to *Biomass & Bioenergy* (ISSN: 0961-9534, Impact factor: 3.646 (JCR/ISI 2012) as Raposo, R.S. et al. (2013). Isolation and characterization of new *Jatropha curcas* polymorphic markers from microsatellite double-enriched genomic libraries.

## **Abstract**

We describe twenty-three novel microsatellite loci for *Jatropha curcas*, a perennial bush-tree from the Euphorbiaceae family and possibly native to Central America and the Caribbean. Two double-enriched genomic libraries were constructed based on a double-hybridization procedure and screened for tandem repeats. Clones indicating the presence of repeat motifs were sequenced and based on the designed primers PCR assays were carried out to determine optimum reaction conditions for each locus. From a total number of 23 microsatellites, 8 polymorphic loci were identified and characterized. The allelic sizes ranged from 88 to 285 bp, in 50 accessions from Guatemala. The average number of alleles per locus and allelic richness were  $5.5 \pm 1.4$  and  $5.4 \pm 1.4$ , respectively. The markers averaged high levels of observed ( $0,684 \pm 0,074$ ) and expected ( $0,653 \pm 0,074$ ) heterozygosities. Departure from Hardy–Weinberg equilibrium was observed at one loci after Bonferroni correction for multiple comparisons. Over all possible pairwise comparisons, no pair of loci showed significant linkage disequilibrium. These molecular markers should provide useful tools for the determination of genetic structure and diversity in *J. curcas* throughout its range. The remaining 15 monomorphic loci may also become useful as a new source of data for plant species-level phylogenetics and for population genetics.

**Keywords:** microsatellites, energy crop, *Jatropha curcas*, genetic studies, polymorphism.

## 2.1 Introduction

*Jatropha curcas* is a perennial bush-tree from the Euphorbiaceae family and possibly native to Central America and the Caribbean. The genus *Jatropha*, which contains approximately 170 known species, is found almost in all tropical and subtropical countries of the world (FAIRLESS, 2007). At present, the species *J. curcas*, rich in oil content, has been seriously taken as a Biofuel alternative. One of the major limitations for successful cultivation of *J. curcas*, however, is the selection of planting material due to its narrow genetic base (RANADE et al., 2008).

With the increasing interest in *J. curcas* as a crop for oil seed production (BERCHMANS; HIRATA, 2008), the development of molecular tools for monitoring and selecting natural populations for breeding and conservation programs has become of paramount importance. The use of molecular markers to gather genetic information for the estimation of intra-specific diversity, the selection of prospective plant materials and the identification of useful traits in marked-assisted selection can be of assistance in efficient breeding strategies.

Among the different classes of markers microsatellite DNA, or Simple Sequence Repeats (SSRs), has proved to be of particular interest due to its high levels of inter- and intra-specific polymorphism. Microsatellite loci are present in nuclear and organellar DNA and consist of short stretches of tandemly-repeated DNA with 2 to 5 base pairs in length (DINIZ et al., 2007). The genetic variation is present in the number of repeats of certain microsatellite loci, a result of slippage of the DNA polymerase during replication (TAUTZ *et al.*, 1986). Microsatellites have proven to be extremely useful as nuclear DNA tags and their efficiency is reflected on the fact that polymorphism can be detected even between close-related individuals. These multi-allelic markers are easy to score with polymerase chain reaction (PCR), and allelic variants of a microsatellite locus are codominant and show

Mendelian inheritance (TAUTZ, 1989). So far, only dinucleotide microsatellites are available in the literature for *J. curcas*. However, tri and tetranucleotide repeat microsatellites have the advantage of giving less pronounced “stutter” bands in PCR, more reproducibility, and consequently easier to genotype. Therefore, these types of microsatellite markers have more potential in population genetic analysis (ELLEGREN, 2004).

Herein, we describe the isolation and amplification of 23 new microsatellite loci from *J. curcas*, using a new double-enrichment hybridization procedure, with the aim of studying the genetic structure and diversity of the species.

## **2.2 Materials and Methods**

### ***Sample collection and tissue preparation***

---

Fresh young plant leaves of *Jatropha curcas* were collected from the Biocombustibles de Guatemala S.A. (n=50), and kept on ice to prevent nucleases to break down DNA. After which samples (leaves) were brought to the Molecular Biology and Biotechnology Laboratory at Embrapa Mid-North (Piauí) and stored into a plastic bag with silica gel to dehydrate. Approximately 20 mg silica gel-dried young leaves were grounded in 2.0 mL microtubes contained ceramic grinding beads (CK28, BioAmerica) with two 16 sec pulses at 5,200 rpm with 10 sec intervals on a Precellys<sup>®</sup>24 Tissue Homogenizer (Bertin Technologies).

### ***DNA extraction***

High molecular weight DNA was extracted from fresh young plant leaves using the *DNeasy Plant Mini Kit* (QIAGEN) according to manufacturer’s instructions and checked for quality and quantity on a 1% agarose gel electrophoresis with ethidium bromide. DNA

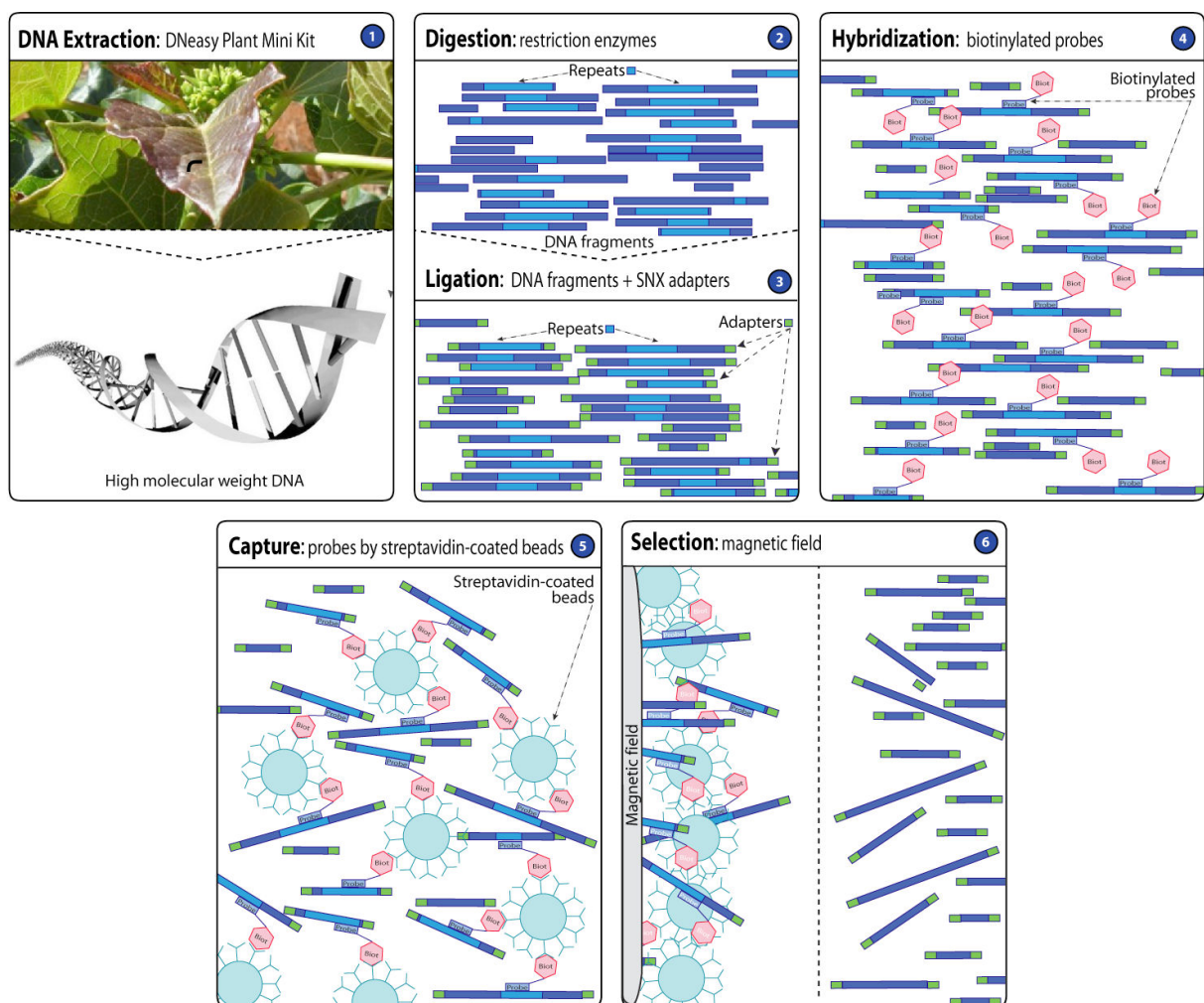


concentration was measured using NanoDrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific) as well. DNA was maintained at -20°C until further analyses.

### Genomic library construction

Microsatellite isolation was carried out as outlined in Glenn & Schable (2005) and Diniz et al. (2007), with modifications. A schematic diagram of the protocol is presented in Figure 2.1.

**Figure 2.1.** Diagram of the enrichment strategy used in this study (after Glenn; Schable, 2005; Diniz et al., 2007).



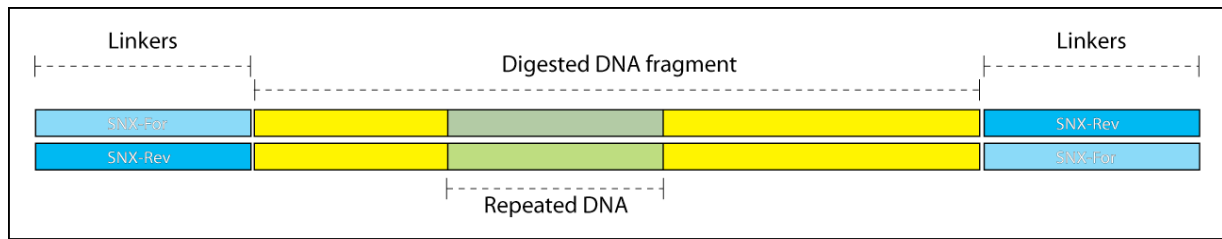
A genomic library was constructed by first independently digesting extracted DNA (approx. 2 µg) using different blunt end restriction enzymes (*RsaI*, *BstUI*, *HincII* and *DraI*) in the presence of bovine serum albumin (BSA) at 37°C overnight to generate fragments of 300-1000 bp. Restriction enzymes were inactivated by heating the solution to 65°C for 20 min. Digested and undigested DNA were visualised on a 1.5% agarose gel to confirm cutting and find appropriate restriction enzyme for the specific genome. Different concentrations of RE were tested. All restriction enzymes were supplied by New England Biolabs (NEB).

Digests were recovered using Qiaquick PCR Purification columns (QIAGEN) according to manufacturer's instructions. These gDNA digests were dephosphorylated at their 5' ends with calf intestinal alkaline phosphatase (CIP) to decrease the likelihood of insert fragments from different chromosomal locations ligating to themselves, therefore avoiding chimeric formation. Dephosphorylation took place at 37°C for 2 hours on a thermocycler (MJ Research DNA Engine Tetrad PTC-225). Digested-dephosphorylated genomic DNA was cleaned of all modifying enzymes using Qiaquick PCR Purification columns (QIAGEN).

#### *Ligation and subtractive hybridization*

After selection, the best restriction enzyme-digested DNA was then ligated to SNX linkers (SNX-For: 5'- CTA AGG CCT TGC TAG CAG AAG C-3' and SNX-Rev: 5'- *p*GCT TCT GCT AGC AAG GCC TTA GAA AA-3' (Figure 2.2), where *p* indicates phosphorylation), with T4 DNA Ligase (NEW ENGLAND BIOLABS) in the presence of *XmnI* to prevent blunt-ended dimers between complementary linkers.

**Figure 2.2** Graphic representation of SNX linkers.



Linker-ligated inserts were amplified by a symmetric PCR with the SNX forward linker as primer. Cycle number was optimized to minimize over-amplification of products. PCR conditions were as follows: [1× 95°C for 5min, 20× (95°C for 45 s, 62°C for 1 min, and 72°C for 2 min), 1× 72°C for 30 min]. Amplifications were carried out in 50-μL reaction volume containing 20-100 ng DNA, 1× Thermopol buffer (+1.5mM MgCl<sub>1</sub>), 50 μM each dNTP, 0.5U *Taq* DNA polymerase (Thermopol, New England Biolabs), 0.3–0.5 μM of SNXF on a MJ Research DNA Engine Tetrad PTC-225 thermocycler.

PCR products, linker-ligated DNA, were recovered using Qiaquick PCR Purification columns and was enriched for repeat motifs using subtractive hybridization with biotinylated tetranucleotide probes [i.e., (GATA)<sub>7</sub>; (GACA)<sub>6</sub>; (AATG)<sub>6</sub>; (ACTC)<sub>6</sub>; (ACTG)<sub>6</sub>; (ACCT)<sub>6</sub>; (ACAG)<sub>6</sub> ; (AAAC)<sub>6</sub>; (AATC)<sub>6</sub>; (AAAG)<sub>6</sub>; **Table 2.1**] (Operon Technologies, Alameda, Calif.) bound to magnetic beads (Dynal Biotech Inc., Lake Success, NY), as outlined in Hamilton et al. (1999).

**Table 2.1** List of probes and combinations used for microsatellite isolation from *Jatropha curcas* and their respective melting temperatures.

Probe name	Concentration and composition of oligonucleotides	T <sub>m</sub> (°C)
Mix A	2,5 μM (ACTC) <sub>6</sub> ; 2,5 μM (ACTG) <sub>6</sub> ; 2,5 μM (ACCT) <sub>6</sub> 2,5 μM (ACAG) <sub>6</sub>	57
Mix B	2,5 μM (AATG) <sub>6</sub> ; 2,5 μM (AAAC) <sub>6</sub> ; 2,5 μM (AATC) <sub>6</sub> ; 2,5 μM (AAAG) <sub>6</sub>	48

Following hybridization the beads were washed at room temperature as follows: four washes in 2× saline sodium citrate buffer (SSC), four washes in 1× SSC, and then four

washes in 0.5× SSC. All washes were carried out for 5 min in the presence of 0.5 ng/μL SNX-F primer; at the beginning of the final wash the beads were transferred to a fresh tube. After the final wash, 30 μL low TE (10 mM Tris, 0.1 mM EDTA, pH 8.0) was added to the beads, the mixture was incubated at 98°C for 15 min to release the DNA from the probes, the tube was spun briefly, and the supernatant containing the heat-released single stranded DNA was transferred to a clean tube.

The microsatellite-enriched eluates recovered from the beads was amplified again via PCR [1× 95°C for 5min, 10× (95°C for 45 s, 62°C for 1 min, and 72°C for 2 min), 1× 72°C for 30 min] in a PTC-225 DNA Engine Tetrad (MJ Research), using SNX-For as primer to generate double-stranded DNA. Once again the number of cycles was optimized to minimize over-amplification of products. PCR products were subjected to 1.5 % agarose gel electrophoresis where the best probes were selected. Amplified-enriched DNA from this hybridization/enrichment step was cleaned with Qiaquick purification columns with a final elution of 50 μL.

Then, a second round of hybridization was performed using a small fraction of the post-enrichment amplified inserts, using the same tetranucleotide probes and hybridization conditions described in this section. This double-enrichment procedure was performed to increase the chance of recovering SSR-containing sequences within DNA fragments (DINIZ et al., 2007).

Double-enriched DNA fragments were recovered from the beads and amplified in 50-μL reactions using 20 mM Tris-HCl, pH 8.4, 50mM KCl, 2.5mM MgCl<sub>2</sub>, 25 μg/μL BSA, 1.0mM dNTP mix, 0.8 μM SNXF, 5.0U of *Taq* polymerase and 10 μL of the enriched DNA. The following programme was used for amplification: 95 °C for 5 min, 20× (95 °C for 45 s, 62 °C for 1 min, 72 °C for 2 min) and 72 °C for 30 min. The number of cycles was varied as well. Double-enrichment amplified DNA was purified with Qiaquick columns.

For all amplifications carried out in this protocol, the number of cycles in the PCR reaction was optimized to minimize over-amplification of products, and possibly the formation of *chimeric* DNA fragments.

#### *Cloning of captured DNA fragments and sequencing of positive clones*

Amplified-enriched DNA from the double-enrichment procedure was cleaned with Purelink™ PCR purification kit (Invitrogen) and ligated into Qiagen pDrive™ Vector (QIAGEN PCR CLONING KIT), which was used to transform NEB 5-alpha competent *Escherichia coli* (DH5" derivative; NEB). Bacteria were inoculated in imMedia™ Amp Blue (Sigma-Aldrich) and grown overnight at 37°C. After the cloning procedure, positive colonies were identified in a white (positive) and blue (negative) screen. The colonies were transferred to Luria–Bertani (LB) broth with ampicillin (100 µg/mL) and allowed to grow for 15 h with constant shaking (225 rpm). Then, 1.0 µL of LB broth containing positive bacteria, transformed and grown in white colonies, was used in PCR amplifications of target sequences, using M13 forward (–20) and reverse (–40) primers and size fractionated on agarose gels (1.5%) and fragments larger than 500 bp were identified.

Plasmid DNA of appropriate length (500–1000 bp inserts, Figure 2.7) was prepared using a Qiaprep spin miniprep kit (QIAGEN) and cycle-sequenced [96°C for 3 min, 40× (96°C for 20s, 52°C for 20s and 60°C for 4 min)] in one direction with a universal primer (T7/M13F) on an ABI 3130 automated DNA analyzer (APPLIED BIOSYSTEMS) using a dye-terminator chemistry. Confirmed positives were further sequenced for the opposite strand using primers SP6/M13R.

#### *Primer designing and optimization*

Repeat regions were initially identified using the software Tandem Repeat

Occurrence Locator (TROLL, CASTELO et al., 2002). Primer pairs for microsatellite loci were designed on the unique flanking regions of each microsatellite locus using PRIMER 3 (ROZEN; SKALETSKY, 2000). Following optimization, 10 loci reliably yielded specific PCR products. Microsatellites were amplified using the following PCR conditions: (I) 1× 95 °C for 10 min, 30× (30 s at 95 °C, 30 s at Ta°C [Table 2.2], 45 s at 72 °C) and 10 min at 72 °C. To optimize the PCR reaction for some primers, an alternate touchdown PCR (DON et al., 1991) was used based on the following profile (II): 95°C for 10 min, 10× (94 °C for 1 min, Ta°C for 30s with annealing temperature decreasing 1 °C per cycle and 72 °C for 30s), and 25× (94 °C for 1 min, Ta°C for 45s, 72 °C for 45s) and finally 72 °C for 1 min. Amplifications were carried out in 20-µL reaction volume containing 20-100 ng DNA, 1.5–2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 µM each dNTP, 0.5 U Taq DNA polymerase (RBC), 0.3–0.5 µM of primer and 1× PCR buffer (10 mM Tris–HCl, pH 8.3; 50 mM KCl) in a VERITI thermocycler (APPLIED BIOSYSTEMS). Microsatellite markers were screened by silver nitrate detection on denatured 6% polyacrylamide gels. Allele sizes were initially determined against a 10 bp DNA ladder (Invitrogen) and by comparison with the expected size of the cloned fragment and then scored manually.

Polymorphic loci were selected for further use based upon the level of polymorphism and allele sizes. If necessary, two or more runs were performed to verify the allele typing, by re-ordering the samples.

#### Statistical Analysis

To obtain baseline allele frequency information, accessions of *J. curcas* were genotyped from a Guatemalan population (n=50). The numbers of alleles at each microsatellite locus, the proportion of individual samples that are heterozygous, observed heterozygosity,  $H_o$ , the estimate of heterozygosity, expected heterozygosity,  $H_e$ , and tests for departure from Hardy-Weinberg expectations (HWE) were performed using the probability

test in GENEPOP version 3.3 (RAYMOND; ROUSSET, 1995). The occurrence of linkage disequilibrium between loci and allelic richness for each locus was calculated using FSTAT 2.9.3 (GOUDET, 1995). Significance levels were adjusted using sequential Bonferroni corrections. Micro-Checker 2.2.3 (VAN OOSTERHOUT et al., 2004) was used to check for null alleles.

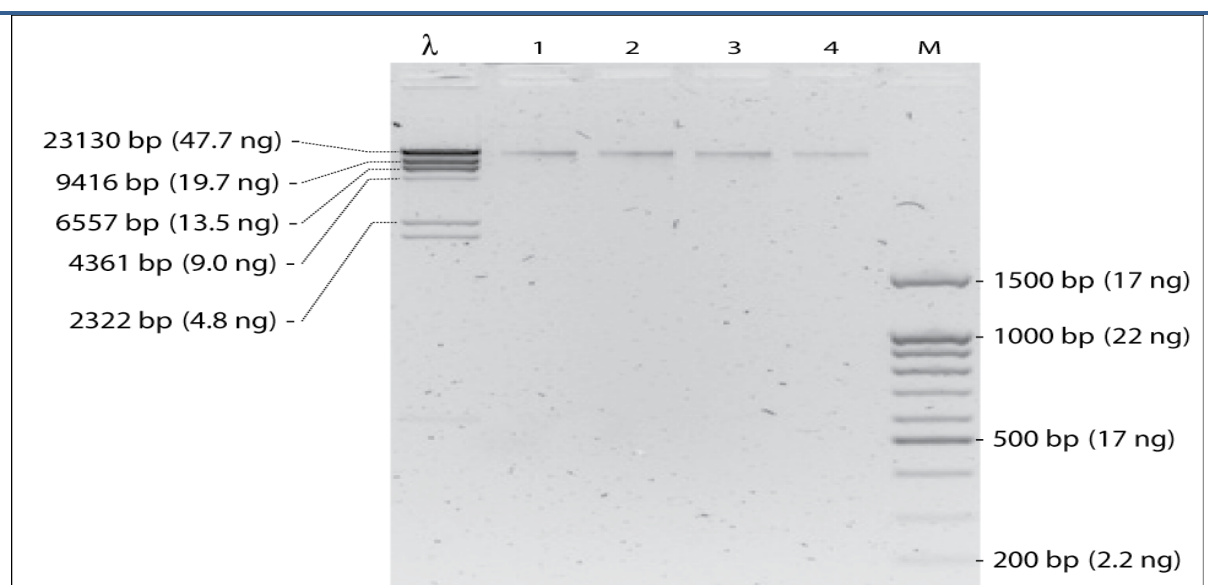
## 2.3 Results and Discussion

---

### *Genomic library construction*

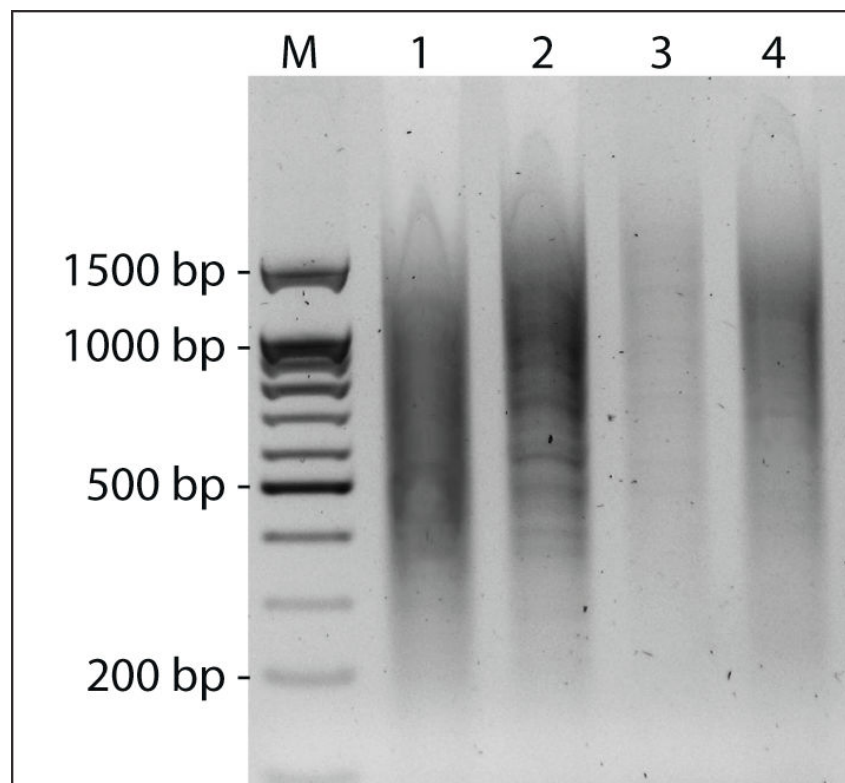
The use of a commercial kit, *DNeasy Plant Mini Kit* (QIAGEN), for isolation of DNA from *J. curcas* leaves yielded high molecular weight DNA of a sufficing concentration (Figure 2.3) to start library construction.

**Figure 2.3.** A subset of genomic DNA extractions, obtained by *DNeasy Plant Mini Kit* (QIAGEN) from fresh young plant leaves. Extracts (1  $\mu$ L) were run on a 1% agarose gel stained with Ethidium Bromide. Molecular markers are ( $\lambda$ ):  $\lambda$  DNA-HindIII Digest (New England Biolabs) and (M): 100 bp DNA Ladder (Promega). 0.1  $\mu$ g of both ladders were loaded. A band towards the top of the gel represents a high molecular weight DNA. Samples 1, 2, 3, 4 were collected from fresh young plant leaves of *Jatropha curcas*.



All tested restriction enzymes (RE) generated fragments between 300 and 1500 bp. However, only *RsaI* and *DraI* were selected for further experiments because of the intense and homogeneous track shown on the agarose gel electrophoresis profile. The enzyme *BstUI* showed fragments of desired length as well, but at low concentration, and therefore, it was not selected for the next steps in the protocol. Restriction of the *Jatropha* genome using *HincII* has yielded high concentrations of fragments of similar sequence, and for this reason the DNA fragments generated by this restriction enzyme were not used for the enrichment procedure (Figure 2.4).

**Figure 2.4** An inverted tone image of an ethidium bromide stained agarose gel (1%) showing the results of restriction of *Jatropha* DNA. Molecular markers (M: 100 bp ladder, GeneRuler™Plus, Fermentas). 1: *RsaI*; 2: *HincII*; 3: *BstUI*; 4: *DraI*. A total of 3  $\mu$ L were loaded.



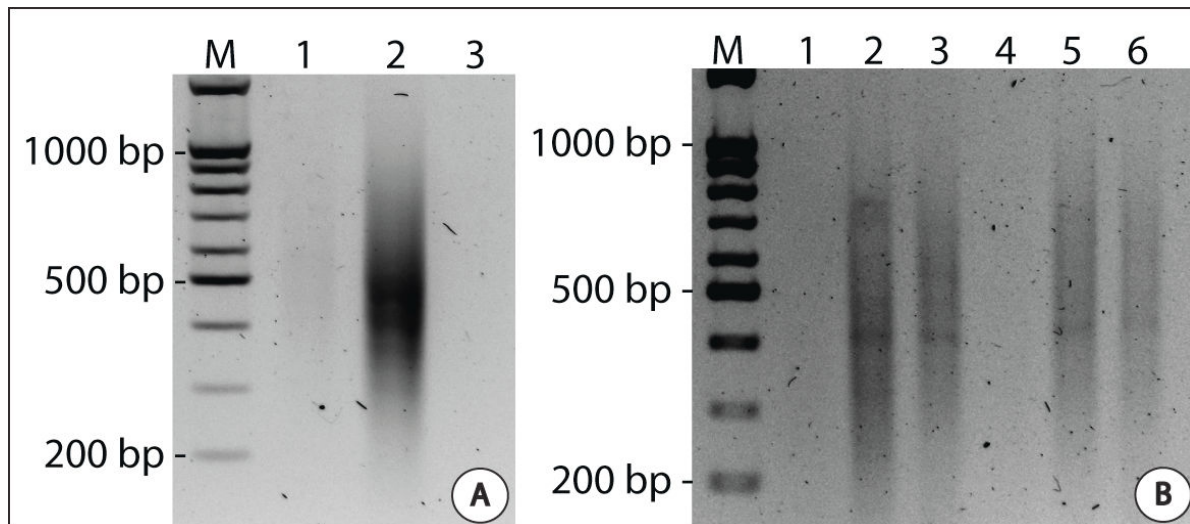


The selection of RE for microsatellite development is more related with the features presented by the genome than the enzyme itself. Therefore, the occurrence of enzyme recognition sites (5'-GT<sup>▼</sup>AC-3' for *RsaI* and 5'-TTT<sup>▼</sup>AAA-3') on the studied genome will determine at which frequency such enzyme will digest the *J. curcas* DNA and, consequently, determine the restriction pattern for a specific enzyme (LYNN et al., 1980).

Linker-ligated DNA fragments were recovered using purification columns and enriched for repeat motifs using subtractive hybridization with biotinylated tetranucleotide probes bound to magnetic beads (Table 2.1) as described in the Materials and Methods section (HAMILTON et al., 1999), after which a PCR was performed using SNX-F as primer to increase the number of fragments.

*DraI*-digested DNA fragments have yielded enriched fragments with both *MixA* and *MixB*. However, after PCR, a band pattern was observed that had compromised their application in microsatellite. Enriched DNA fragments with *MixB* from *RsaI*-digested samples showed satisfactory results, since biotinylated probes have captured high concentration DNA of adequate length (300 to 700 bp). Probes from *MixA* have captured few fragments of the target DNA (Figure 2.5). As a result, the best protocol established for the enrichment of *J. curcas* DNA of putative repeats motifs was the restriction with the *RsaI* enzyme and posterior capture of the fragments using probes (AATG)<sub>6</sub>, (AAAC)<sub>6</sub>, (AATC)<sub>6</sub> and (AAAG)<sub>6</sub>.

**Figure 2.5** An inverted tone image of an ethidium bromide stained agarose gel (1.5%), showing the PCR products of the enriched DNA. A: From *RsaI* digests (1: Mix A, 2: Mix B, 3: blank); B: From *DraI* digests (1-2: Mix A, 3-4: Mix B, 1 and 4: blanks). M: Molecular markers (100bp ladder, GeneRuler™Plus, Fermentas).

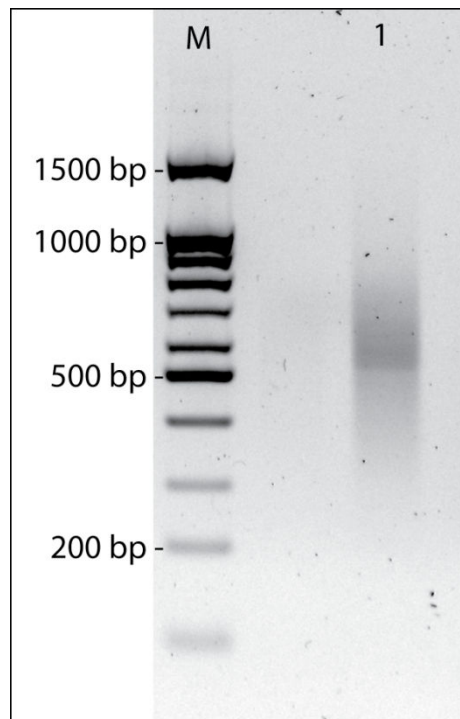


The higher incidence of fragments captured with Mix B is in accordance with the literature (CARVALHO et al. 2008), which has determined that more than 60% of the *J. curcas* genome is constituted of A/T nucleotides. Adenine is the most abundant nucleotide in *MixB*.

A small fraction of the post-enrichment amplified inserts (Fig. 2.5, A, lane 2) was used for a second round of hybridization with the biotinylated probes in *MixB* as described in DINIZ et al. (2007). This approach was also used for lobster microsatellites isolation with significant increase in the number of isolated *loci*, in some cases 100% positive clones with repeats. Double-enriched DNA fragments were recovered and amplified via PCR using SNX-F as primer to yield the gel profile shown in Fig. 2.6. Once again, most of the fragments were identified between 300 and 700 bp in size. This size range facilitates sequencing of fragments

on only one run (5'→3'). Once confirmed the presence of repeat motifs in the short DNA fragment, sequencing was also performed towards to the opposite direction (3'→5').

**Figure 2.6** An inverted tone image of an ethidium bromide stained agarose gel (1.5%), showing the PCR products of the double-enriched DNA. 1: From *RsaI* digests enriched for probes in Mix B. M: Molecular markers (100bp ladder, GeneRuler™Plus, Fermentas).

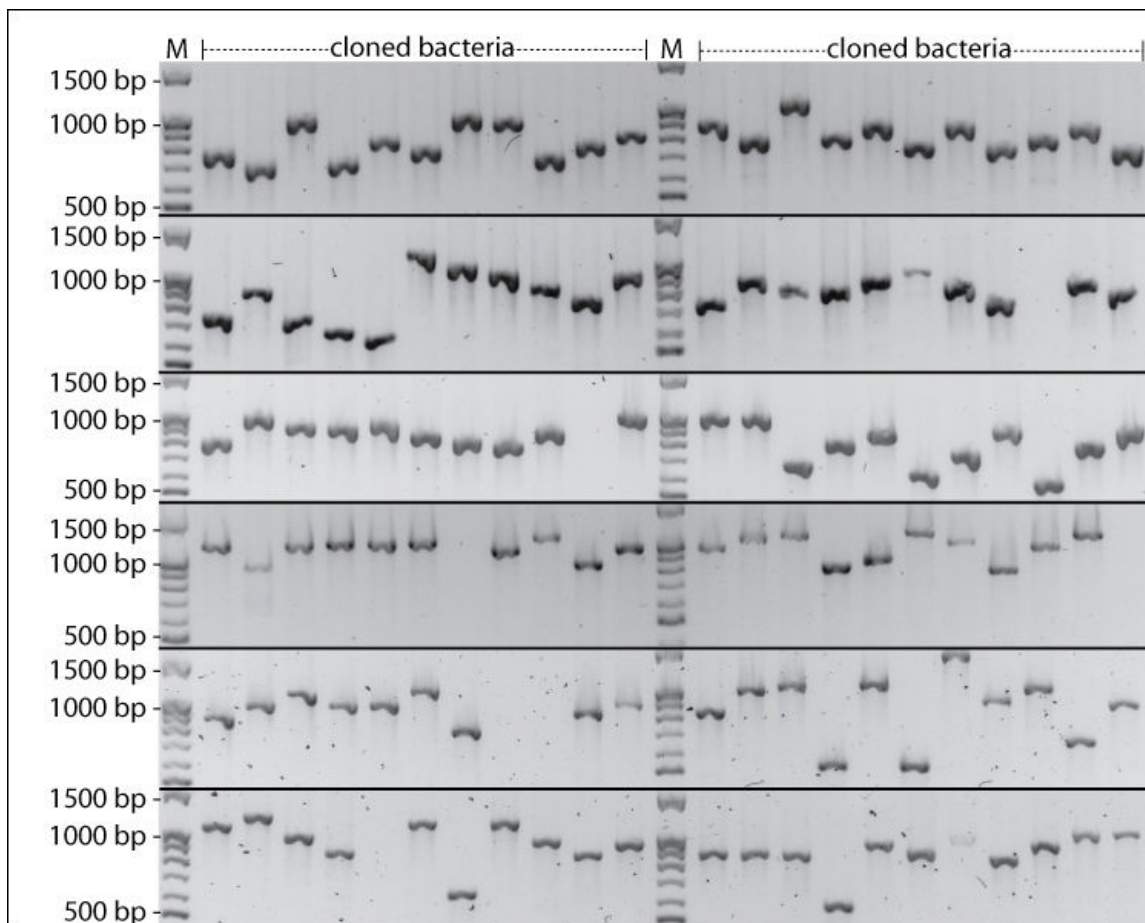


#### *Cloning of captured DNA fragments and sequencing of positive clones*

After the cloning of amplified double-enriched DNA 132 positive colonies were identified in the white-blue screening. Then, the bacteria, which was transformed and grown in white colonies (positive), were PCRed for target sequences (Figure 2.7). Fragments larger than 500 bp were identified in 124 colonies or 93,9% of the clones, which was an additional proof that the libraries enriched for tetranucleotide repeat motifs showed very high levels of

microsatellite enrichment. The overall success rate of the enrichment protocol employed here was probably due to the presence of large numbers of repeats within the *J. curcas* genome, besides the effectiveness of using the hybridization capture (biotin/streptavidin) enrichment technique (KIJAS et al., 1994).

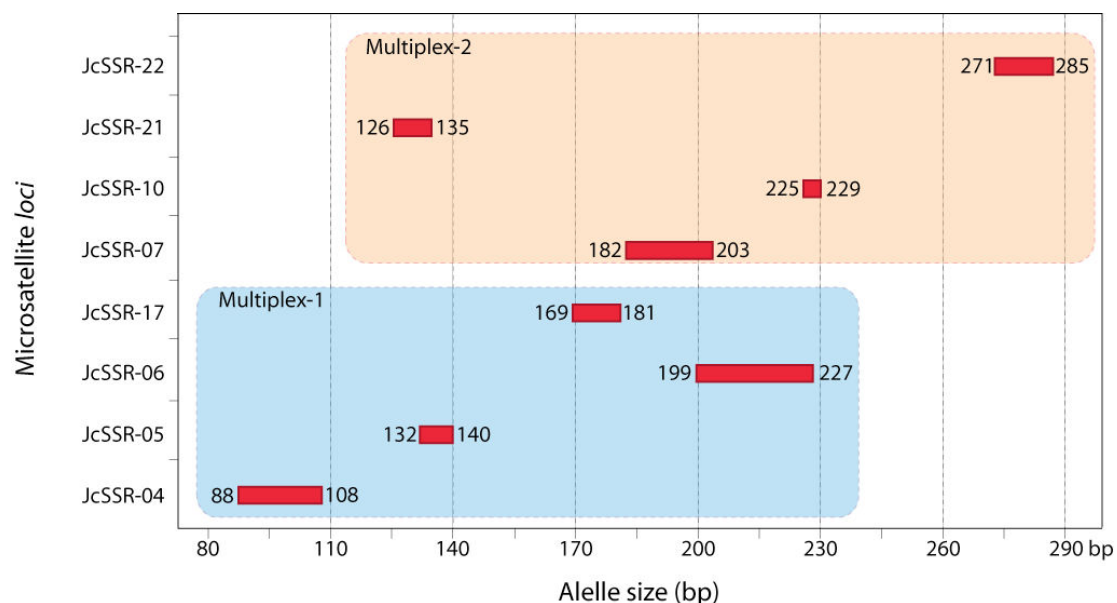
**Figure 2.7** An inverted tone image of an ethidium bromide stained agarose gel (1.5%), showing the results of a subset of the size screening PCR. M: Molecular marker (100bp ladder, GeneRuler™Plus, Fermentas). PCRed vector region (M13F↔M13R): 239bp; PCRed vector region (M13F↔M13R)+ SNX linkers (44bp) = 283bp.



After sequencing, some repeat regions were found to be too short or had low %GC to have primers designed on their flanks. A total of 29 microsatellite primer pairs were designed and after optimization, 23 *loci* had yielded repeatable and scorable PCR products, and 6 failed to amplify. Regions flanking microsatellites with a small number of repeats were not considered for primer designing, because their likelihood of having very low levels of variability or being fixed (AMOS, 1999). Array motifs and GenBank accession numbers are listed in Table 2.2; most arrays were pure tetranucleotide repeats. Of 29 *loci*, 16 (55.17%) contained tetranucleotide microsatellites of which 11 (68.75%) were pure. Eight (27.59%) *loci* were dinucleotides, three (10.34%) were pure trinucleotides, and two microsatellites were a composition of different core repeat motifs.

Optimization of PCR reactions revealed that optimal annealing temperatures varied according to microsatellite *loci* (Table 2.2), but the concentrations of MgCl<sub>2</sub> and primer pairs were fixed at 1.5 mM and 0.3 μM, respectively. This would greatly facilitate the designing of a multiplex PCR in order to reduce the number of PCR reactions needed for genotyping a population and consequently the overall cost of the study (Figure 2.8).

**Figure 2.8.** Distribution of microsatellite *loci* in *Jatropha curcas*. *Loci* are grouped by repeat length for provisional multiplex PCRs.



**Table 2.2** Characteristics of microsatellite loci developed for *Jatropha curcas*.

Locus	Primers sequence (5'-3')	Core Motif	Clone size (bp)	Ta (°C)	Accession Number
JcSSR-01	F: GCTCGAAACTCCATTCACTTG R: CACCAGCGTCATTCCATTC	(AAAC) <sub>6</sub> (CGAA) <sub>12</sub>	265	55	JX069297
JcSSR-02	F: AATGGAATGACGCTGGTG R: CGGAGATTGTGTTGCTACTTC	(AAAC) <sub>14</sub>	139	53	JX069298
JcSSR-03	F: CGAAGTAGCAACACAATCT R: CACGTAAGCTCTCTCACA	(TG) <sub>26</sub>	106	48	JX069299
JcSSR-04	F: TTTCAGTTTTCCCTCACACG R: AGGGTGTTTGGCTTCTGCG	(TC) <sub>14</sub>	100	55/60*	JX069300
JcSSR-05	F: AAGAGAGAACTGAGACGGTTTG R: GATGACGAAGCGTACTGAAC	(TTGT) <sub>10</sub>	136	50	JX069301
JcSSR-06	F: CAGTACCGCCCAAGCAC R: CGTCACTCCCGCTAAGTC	(TTTG) <sub>9</sub>	227	64	JX069302
JcSSR-07	F: TCATCAAGCTAACAAGCCACT R: TCAAGTTTGGACTTGGAAGG	(AAT) <sub>9</sub>	194	60	JX069303
JcSSR-08	F: CTTTTGAAGATTTGCCTGTG R: CAATCCCTCCATGTTTCTCC	(TG) <sub>34</sub>	113	54	JX069304
JcSSR-09	F: TGTGTTTCTGTGTCCAATGTG R: TCGAGAGTATGTGTCTGTTTATGG	(GT) <sub>34</sub>	161	54	JX069305
JcSSR-10	F: TGAAAGTAAGAAAGGAAG R: TCTCTCTATTTAGTTATCTG	(AAAG) <sub>10</sub> (AAAG) <sub>6.25</sub>	229	45	JX069306
JcSSR-11	F: CAGACACACTCACATTCCATC R: CCATCACATCTTCTTTTCTCC	(TC) <sub>21</sub>	198	54	JX069307
JcSSR-12	F: CGTGATCCGGGTGATTATC R: AATCAATTCAGCGAACCAAC	(TG) <sub>21</sub>	188	53	JX069308
JcSSR-13	F: ACATAATGTGGTCAGGTTAT R: AAAGAAGAAAGAAAGAAGG	(TTTC) <sub>13</sub>	147	47	JX069309
JcSSR-14	F: CTTCTTTTCTTTTCTCC R: AGATCGCGTACTGCAC	(TC) <sub>16</sub> (TTC) <sub>3</sub>	121	50	JX069310
JcSSR-15	F: CTCATATTGATGCACGGTAG R: TTCTCCATTCCTTTCTTCC	(AAAG) <sub>5</sub> (GAAA) <sub>10</sub>	172	50	JX069311
JcSSR-16	F: GGAAGAAAGGAATGGAGA R: CTTCTTTTCTTTCTTTTCTTTC	(AAGA) <sub>7</sub>	139	50	JX069312
JcSSR-17	F: ACTCGCCAACCTTCATAATCG	(TCA) <sub>6</sub>	172	58	JX069313

JcSSR-18	R: TGAAATCCAAGGGAATGG F: TGCTGAGGGACAAGTCAAC R: TTCTTCTACACACTCATAGAGACC	(GA) <sub>36</sub> (AC) <sub>13</sub> (AC) <sub>14</sub>	306	53	JX069314
JcSSR-19	F: GGCTTGTGTGGGTGGTATC R: AATAATGCTATCGCTGTGACC	(AAAC) <sub>14</sub>	133	54	JX069315
JcSSR-20	F: GGATAACTCATTTCGTGTCTTGC R: GACGCTACGTGATTTTCGAG	(AACA) <sub>7</sub> (AACAAACG) <sub>7</sub> (AACAAACGAACAAACA) <sub>4</sub> (AACA) <sub>14</sub>	388	54	JX069316
JcSSR-21	F: AGTGGATGAGAACAATGCAC R: GAAAGCAACGGTAGTATCTGG	(ATC) <sub>6</sub>	129	58	JX069317
JcSSR-22	F: GCAATCACATAACCTCCAAGA R: AGCCTTTTCCTGTTGTTTCAG	(AG) <sub>14</sub>	271	58	JX069318
JcSSR-23	F: TGTGAAGTGGCTCAAACG R: CAGTAGGAGAAGACAGAGACC	(CTTC) <sub>6</sub>	250	53	JX069319

\*: Touchdown PCR.

However, as one microsatellite locus (JcSSR-04) failed to consistently amplify at this temperature or even lower ones, an alternative touchdown PCR was designed.

Genotyping of *J. curcas* accessions from the Guatemalan population revealed 15 monomorphic loci. Eight loci were selected for further use based upon polymorphism and allele sizes (Table 2.3).

The average number of alleles per locus and allelic richness were  $5.5 \pm 1.4$  and  $5.4 \pm 1.4$ , respectively, expected heterozygosity was  $0,653 \pm 0,074$  and observed heterozygosity was  $0,684 \pm 0,074$  (Table 2.3). The allelic sizes ranged from 88 to 285 bp. Distributions of allele frequencies in the *J. curcas* population are depicted in Figure 2.9. Analysis with Micro-Checker indicated few null alleles for locus JcSSR-05 in Guatemalan populations, which may be a possible cause of its deviation from Hardy–Weinberg equilibrium, even after Bonferroni correction for multiple comparisons. No loci showed significant linkage disequilibrium after Bonferroni correction.

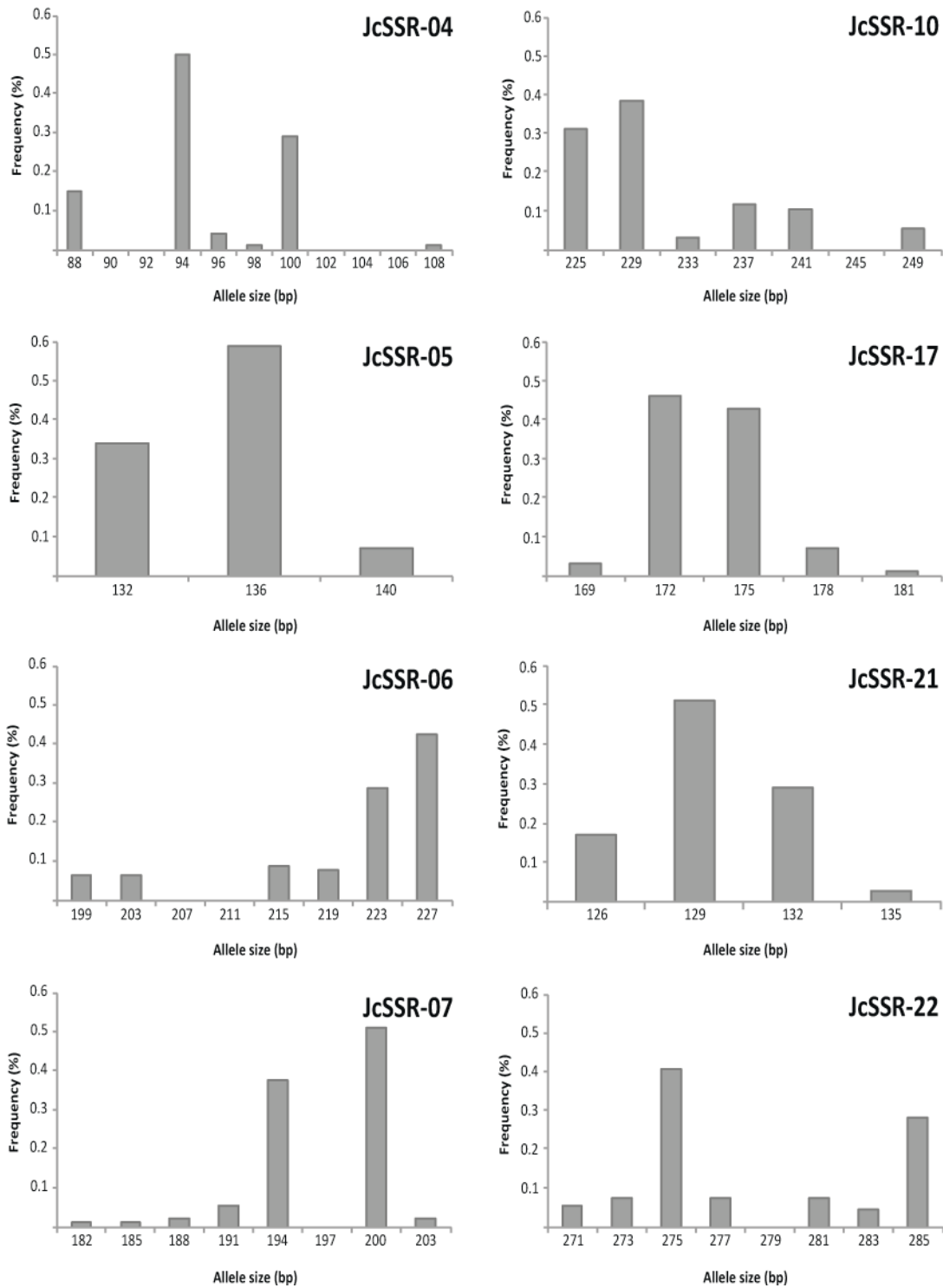


**Table 2.3** Characterization of eight primer pairs that amplify polymorphic short tandem repeats from *Jatropha curcas* <sup>1</sup>.

Loci	Sequence (5' → 3')	Core Motif	Ta (°C)	Number of alleles	Allelic richness	Size range <sup>2</sup> / Clone size <sup>3</sup> (bp)	H <sub>O</sub> <sup>4</sup>	H <sub>E</sub> <sup>5</sup>	F <sub>IS</sub> <sup>6</sup>
JcSSR-04	F: TTTCAGTTTTCCCTCACACG R: AGGGTGTTTGGCTTCTGCG	(TC) <sub>14</sub>	TDW 55°/60°	6	5.599	88-108/100	0.720	0.648	-0.112
JcSSR-05	F: AAGAGAGAACTGAGACGGTTTG R: GATGACGAAGCGTACTGAAC	(TTGT) <sub>10</sub>	50°	3	3.000	132-140/136	0.680	0.537	-0.270*
JcSSR-06	F: CAGCTACCGCCCAAGCAC R: CGTCACTCCCGCTAAGTC	(TTTG) <sub>9</sub>	64°	6	6.000	199-227/227	0.775	0.725	-0.070
JcSSR-07	F: TCATCAAGCTAACAAGCCACT R: TCAAGTTTGGACTTGGAAGG	(AAT) <sub>9</sub>	60°	7	6.614	182-203/194	0.646	0.601	-0.075
JcSSR-10	F: TGAAAGTAAGAAAGGAAG R: TCTCTCTATTTAGTTATCTG	(AAAG) <sub>10</sub> (AAAG) <sub>6</sub>	45°	6	5.996	225-249/229	0.646	0.734	0.121
JcSSR-17	F: ACTCGCCAACCTCATAATCG R: TGAAATCCAAGGGAATGG	(TCA) <sub>6</sub>	58°	5	4.811	169-181/172	0.571	0.606	0.057
JcSSR-21	F: AGTGGATGAGAACAATGCAC R: GAAAGCAACGGTAGTATCTGG	(ATC) <sub>6</sub>	58°	4	3.993	126-135/129	0.640	0.632	-0.012
JcSSR-22	F: GCAATCACATAACCTCCAAGA R: AGCCTTTTCCTGTTGTTTCAG	(AG) <sub>14</sub>	58°	7	6.999	271-285/271	0.792	0.743	-0.066

<sup>1</sup> 50 samples genotyped; <sup>2</sup> Observed distribution of alleles at each locus; <sup>3</sup> Size of the PCR product amplified from the clone used to develop each locus; <sup>4</sup> Observed heterozygosity; <sup>5</sup> Expected heterozygosity; <sup>6</sup> Inbreeding coefficient.

**Figure 2.9** Distributions of allele frequencies at the eight polymorphic *microsatellite* loci in *J. curcas* populations.



The polymorphic microsatellite loci described in this study are expected to be useful markers for estimating fine scale population processes of the species. The remaining 15 monomorphic loci may also become useful as a new source of data for plant species-level phylogenetics and for population genetics. Current research has indicated that their flanking regions may be used as a new tool for genetic studies (NAZARENO; REIS, 2011; CHATROU et al., 2009). On the other hand, it is still expected that the reported monomorphic loci may become polymorphic when additional accessions are sampled. Ongoing research is involved in applying these markers for genetic structure in cultivated and natural populations of *Jatropha curcas* throughout its range.

### **Acknowledgements**

This study was supported by the Brazilian Government, the Brazilian Ministry of Science and Technology (MCT) through an FINEP grant (BRJATROPHA Project), The Bank of Northeastern Brazil (BNB/ETENE/FUNDECI) and the Brazilian Agricultural Research Corporation (Embrapa). R.S. Raposo is a doctorate candidate from the Rede Nordeste de Biotecnologia. I.G.B. Souza and FBBritto were supported by CNPq (research scholarship no. 384697/2011-9) and the FAPEPI/CNPq-DCR Fellowship Program, respectively.

## References

- AMOS, W. A comparative approach to the study of microsatellite evolution. In: *Microsatellites; Evolution and Applications*, Goldstein DB, Schlotterer C, eds., **Oxford University Press**, Oxford, p. 67–79, 1999.
- BERCHMANS, HJ; HIRATA, S. Biodiesel production from crude *Jatropha curcas* L. seed oil with a high content of free fatty acids. **Bioresources Technol**, v. 99, p. 1716–1721, 2008.
- CARVALHO, CR; CLARINDO, WR; PRAÇA, MM; ARAÚJO, FS; CARELS, N. Genome size, base composition and karyotype of *Jatropha curcas* L., an important biofuel plant. **Plant Sci**, v. 174, p. 613–617, 2008.
- CASTELO, A; MARTINS, W; GAO, G. Troll - Tandem Repeat Occurrence Locator. **Bioinformatics**, v.18, p.634–636, 2002.
- CHATROU, LW; ESCRIBANO, MP; VIRUEL, MA; MAAS, JW; RICHARDSON, JE; HORMAZA, JI. Flanking regions of monomorphic microsatellite loci provide a new source of data for plant species-level phylogenetics. **Mol Phylogenet Evol**, v.53, n.3, p. 726–733, 2009.
- DINIZ, FM; IYENGAR, A; LIMA, PSC; MACLEAN, N; BENTZEN, P. Application of a double enrichment procedure for microsatellite isolation and the use of tailed primers for high throughput genotyping. **Gen Mol Biol**, v.30, p. 380–384, 2007.
- DON, RH; COX, PT; WAINWRIGHT, BJ; BAKER, K; MATTICK, JS. Touchdown PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. **Nucleic Acids Res.**, v.19, n.14, p.4008, 1991.
- ELLEGREN, H. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. **Nat Rev Gen**, v.5, p. 435–445, 2004.

- FAIRLESS, D. Biofuel: the little shrub that could—maybe. **Nature**, v.449, p.652–655, 2007.
- GLENN, TC; SCHABLE, NA. Isolating microsatellite DNA loci. **Methods in Enzymology**, v.395, p. 202–222, 2005.
- GOUDET, J. Fstat: a computer program to calculate F-statistics. **J. Hered**, v.86, p. 485–486, 1995.
- HAMILTON, MB; PINCUS, EL; DI FIORE, A; FLEISCHER, RC. Universal linker and ligation procedures for construction of genomic DNA libraries enriched for microsatellites. **BioTechniques**, v.27, p. 500–507, 1999.
- KIJAS, JMH; FOWLER, JCS; GARBETT, CA; THOMAS, MR. Enrichment of microsatellites from the citrus genome using biotinylated oligonucleotide sequences bound to streptavidin-coated magnetic particles. **BioTechniques**, v.16, p.656–662, 1994.
- LYNN, SP; COHEN, LK; KAPLAN, S; GARDNER, JF. *RsaI*: a new sequence-specific endonuclease activity from *Rhodopseudomonas sphaeroides*. **J. Bacteriology**, v.142, p.380–383, 1980.
- NAZARENO, AG; DOS REIS, MS. The same but different: monomorphic microsatellite markers as a new tool for genetic analysis. **Am J Bot**, v.98, n.10, p. 265–267, 2011.
- RANADE, SA; SRIVASTAVA, AP; RANA, TS; SRIVASTAVA, J; TULI, R. Easy assessment of diversity in *Jatropha curcas* L. plants using two single-primer amplification reaction (SPAR) methods. **Biomass & Bioenergy**. v.32, p.533–540, 2008.
- RAYMOND, M; ROUSSET, F. GENEPOP, Version 1.2: Population genetics software for exact tests and eucumenicism. **J. Hered**, v.86, p.248-249, 1995.

- ROZEN, S; SKALETSKY, HJ. Primer3 on the WWW for general users and biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S. (Ed.). *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*, Humana Press, Totowa, USA. **Human Press**, p.365–386, 2000.
- TAUTZ, D. Criptic simplicity in DNA is a major source of genetic variation. **Nature**. v.322, p. 652–656, 1986.
- TAUTZ, D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. **Nucleic Acids Res**, v.17, p.6463–6471, 1989.
- VAN OOSTERHOUT, C; HUTCHINSON, WF; WILLS, DPM; SHIPLEY, P. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. **Mol Ecol Notes**, v.4, p.535–538, 2004.

### Capítulo III

---

Development of novel SSR markers for *Jatropha curcas* from genomic sequence survey database \*<sup>1</sup>

---

\*<sup>1</sup> This chapter was submitted to *International Journal of Biological Sciences* (ISSN: 1449-2288), Impact factor: 2.699 (JCR/ISI 2012) as Raposo, R.S. et al. (2013). Development of novel SSR markers for *Jatropha curcas* from genomic sequence survey database.

## **Abstract**

The last few years have seen a significant increase in the number of large-scale sequencing projects generating whole genome databases. These sequence databases can be surveyed (genome sequence survey – GSS) for tandem repeats as an alternative means to develop microsatellites for monitoring and selecting natural populations and cultivars of *Jatropha curcas*. A total of 100 tandem repeats were revealed from mining 368 genomic surveyed sequences available in the Kazusa DNA Research Institute database. Twenty microsatellite sequences were successfully amplified resulting in repeatable and scorable PCR products. Genotyping of *J. curcas* accessions from the Guatemalan population revealed 18 polymorphic loci. The average number of alleles per locus was 6.9 and allelic sizes ranged from 94 to 299 bp. Expected and observed heterozygosities ranged from 0.118 to 0.906 and from 0.082 to 0.794, respectively. PIC values ranged from 0.114 (JcSSR-34) to 0.886 (JcSSR-33) with an average of 0.627. Analysis with Micro-Checker indicated few null alleles for locus JcSSR-37 in Guatemalan populations, which may be a possible cause of its deviation from Hardy–Weinberg equilibrium, even after Bonferroni. No loci showed significant linkage disequilibrium. These microsatellite loci are expected to be valuable molecular markers as they show high levels of polymorphism and heterozygosity.

**Keywords:** genomic survey sequences, microsatellites, energy crop, *Jatropha curcas*, polymorphism



## Introduction

*Jatropha curcas* is a plant with possible origin in Central America and, currently, distributed on almost all the regions of the world (CORTESÃO, 1956; PEIXOTO, 1973; FAIRLESS, 2007). Its commercial interest has been sparked by its strong potential in the production of alternative fuels, mainly due to high oil yield (BERCHMANS; HIRATA, 2008). The species exists in climates that are unfavorable for most food crops, and occurs spontaneously in very poor fertility soils (ARRUDA et al., 2004), *Jatropha curcas* can be considered one of the most promising alternative oil source to replace petroleum diesel. The plant is very resistant to disease, insect attack, molluscs and fungi because segregates a caustic latex that drips from damaged or torn leaves (LAKSHMANAN et al., 1990; ABDEL-HAMID, 2003; EMEASOR et al., 2005).

Along with the growing interest in the exploitation and commercial cultivation of *J. curcas*, the development of molecular technologies for monitoring and selecting natural populations and cultivars becomes of paramount importance. The sustainability of the activity must go through the implementation of molecular techniques based on DNA analysis.

In this context, molecular markers such as microsatellites have been widely used. Microsatellites are repeated sequences of nucleotides distributed throughout the genome, which occur mainly in non-coding regions (SCHLOTTERER; WIEHE, 1999; HANCOCK, 1999). These sequences are used as markers due to their highly polymorphic pattern. Microsatellites can be used not only in the conservation of genetic resources of commercial interest, but also in the selection of plants with desirable features for cultivation and identification of quantitative trait loci (QTLs) related to diseases or reproduction (NAMBISAN, 2007).

The last few years have seen a significant increase in the number of large-scale sequencing projects generating whole genome databases. These sequence databases can be surveyed (genome sequence survey – GSS) for tandem repeats as an alternative means to develop microsatellites, which may represent a useful and low-cost procedure for discovering novel microsatellites markers in a genome. Now that the whole genome of *Jatropha curcas* has been sequenced (SATO et al., 2011) it is valuable to use the database for mining microsatellite loci in the species.

Thus, the present study aimed at mining part of the *J. curcas* genome database to increase the availability of microsatellites, which shall hereafter intended for the genetic analysis of *Jatropha curcas* in Brazil.

## **Materials and Methods**

### *Identification of repeated regions and primer design*

A total of 368 *contig consensus sequences* were downloaded from the Kazusa DNA Research Institute database ([www.kazusa.or.jp/jatropha/](http://www.kazusa.or.jp/jatropha/)). These surveyed sequences were screened for mining tandem repeats using the software Tandem Repeat Occurrence Locator (TROLL, CASTELO et al. 2002). Primer pairs for microsatellite loci were designed on the unique flanking regions of each repeat (dinucleotide, trinucleotide, tetranucleotide and pentanucleotide) using PRIMER 3 with the default settings (ROZEN; SKALETSKY, 2000), but with a fragment length limit of 300 bp. The presence of multiple tandem repeats at distant sites in the same contig sequence allowed the design of different primer pairs targeted on each microsatellite. Only one pair of primers was designed for contiguous microsatellites, even if separated by few bases.

### *Plant material and DNA isolation*

Fresh young plant leaves of *Jatropha curcas* were collected from the Biocombustibles de Guatemala S.A. germplasm bank and stored into a plastic bag with silica gel to dehydrate. Approximately 20 mg of plant tissue were grounded in 2.0 mL microtubes contained ceramic grinding beads (CK28, BioAmerica) with two 16 sec pulses at 5,200 rpm with 10 sec intervals on a Precellys<sup>®</sup>24 Tissue Homogenizer (Bertin Technologies). These homogenized materials were used for DNA isolation with *DNeasy Plant Mini Kit* (QIAGEN) according to manufacturer's instructions and checked for quality and quantity on a 1% agarose gel electrophoresis with ethidium bromide. DNA concentration was measured using NanoDrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific) as well. DNA was maintained at -20°C until further analyses.

### *PCR amplification and microsatellite markers polymorphism*

Forty-nine accessions of *J. curcas* from Guatemala were used for the characterization of microsatellite markers. PCR amplifications and optimization of primers were performed in a total reaction volume of 10  $\mu$ L consisting of 1.0  $\mu$ L of template DNA (20-100 ng), 1.5–2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50  $\mu$ M each dNTP, 0.5 U Taq DNA polymerase (RBC), 0.3–0.5  $\mu$ M of the forward and reverse primers, and 1 $\times$  PCR buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.3; 50 mM KCl) in a Veriti<sup>®</sup>96-well thermalcycler (Applied Biosystems). The cycling conditions included an initial denaturation cycle at 95°C for 2 min, followed by 30 cycles of 95°C for 45 sec, 30 sec for annealing (temperature depending on of each primer pair, Table 3.2), 45 sec for extension at 72°C, and a final extension at 72°C for 10 min.

Microsatellite markers were screened on denatured 6% polyacrylamide gels and then silver nitrate stained for genotype scoring. Allele sizes were initially determined against a 10 bp DNA ladder (Invitrogen) and by comparison with the expected size of the cloned fragment and then scored manually. If necessary, two or more runs were performed to verify the allele typing, by re-ordering the samples.

### *Statistical Analysis*

The numbers of alleles at each microsatellite locus, the proportion of individual samples that are heterozygous, observed heterozygosity,  $H_o$ , the estimate of heterozygosity, expected heterozygosity,  $H_e$ , and tests for departure from Hardy-Weinberg expectations (HWE) were performed using the probability test in GENEPOP version 3.3 (RAYMOND; ROUSSET, 1995). Allele frequencies obtained from the microsatellite genotypes were also used to calculate the polymorphic information content (PIC) of each locus using Cervus 3.0 (MARSHALL et al., 1998; KALINOWSKI et al., 2007) in order to measure the degree of polymorphism obtained by a microsatellite. The occurrence of linkage disequilibrium between loci and allelic richness for each locus was calculated using FSTAT 2.9.3 (GOUDET, 1995). Significance levels were adjusted using sequential Bonferroni corrections. Micro-Checker v2.2.3 was used to determine the most probable cause of any deviation from HWE (Van Oosterhout et al., 2004).

## Results and Discussion

A total of 100 (27.17%) tandem repeats were revealed from mining 368 genomic surveyed sequences (contigs) available in the Kazusa DNA Research Institute database for *Jatropha curcas*. From these microsatellite-containing sequences 71 % were of dinucleotide repeats, 28% trinucleotides and 1 % of tetranucleotides. Since primer designing was not considered for flanking regions of microsatellites with a small number of repeats, as low levels of variability or fixation is expected (AMOS, 1999), efforts focused provisional markers with more than 8 tandem repeats. Additionally, other repeat regions were also found to be too short or had low %GC to have primers designed on their flanks. Twenty microsatellite sequences were successfully amplified resulting in repeatable and scorable PCR products.

Of 20 *loci*, 18 (90%) contained dinucleotide microsatellites of which 16 (88.9%) were pure, with only two other sequences characterized as compound dinucleotides. Two *loci* were trinucleotides repeats (Table 3.1).

Genotyping of *J. curcas* accessions from the Guatemalan population revealed 18 polymorphic *loci*, however, primers for locus JcSSR-38b were merely designed as an amplification alternative. The rest 2 *loci* were monomorphic (Table 3.2).

The average number of alleles per locus was 6.9, ranging from 3 (JcSSR-38a/b and JcSSR-42) to 16 (JcSSR-33). The allelic sizes ranged from 94 to 299 bp. A distribution of microsatellite *loci* in *Jatropha curcas* based on repeat length is depicted on Figure 3.1. Expected and observed heterozygosities ranged from 0.118 to 0.906 and from 0.082 to 0.794, respectively. Distributions of allele frequencies in the *J. curcas* population are shown in Figure 3.2. Mean expected and observed

heterozygosities were 0.675 and 0.593. PIC values ranged from 0.114 (JcSSR-34) to 0.886 (JcSSR-33) with an average of 0.627. This genetic parameter is an important estimate of the extent of polymorphism of the marker (DeWoody, 1995). PIC values higher than 0.5 are considered highly informative. PIC between 0.25 and 0.50 indicates a reasonably informative locus (Botstein et al. 1980). Therefore, all the analyzed microsatellites were informative in the Guatemalan population of *J. curcas*, except for the marker JcSSR-34 (PIC: 0.114). Analysis with Micro-Checker indicated few null alleles for locus JcSSR-37 in Guatemalan populations, which may be a possible cause of its deviation from Hardy–Weinberg equilibrium, even after Bonferroni correction for multiple comparisons at 5% significance level (critical value for  $p > 0.0029$ ). No loci showed significant linkage disequilibrium after Bonferroni correction.



JcSSR-41	JCCA0010831	gtacgagcgtggactaacctcacctgatgtgtcgggtgctgctaaaaatcatgcatgacgtggggccattgatgctccaagccgtcacattaccgcc <u>atatatatatatatatatatatatatat</u> <u>ata</u> tcttccglttcaaaatattgtaatgtcaatttttaaaaacacattaattgtattctcataatataaaaatctatatatttctaaaattgtcctcctttaa	(TA) <sub>21</sub>	169
JcSSR-42	JCCA0108601	Tgcatcaacacatccattcttccaccaa <u>atatatatatatata</u> aagaaaactctgagataaaattctgcaataacttctcaatctgctgaattagaatcaagttgaaattccaatgctactcca ctc	(AT) <sub>10</sub>	138

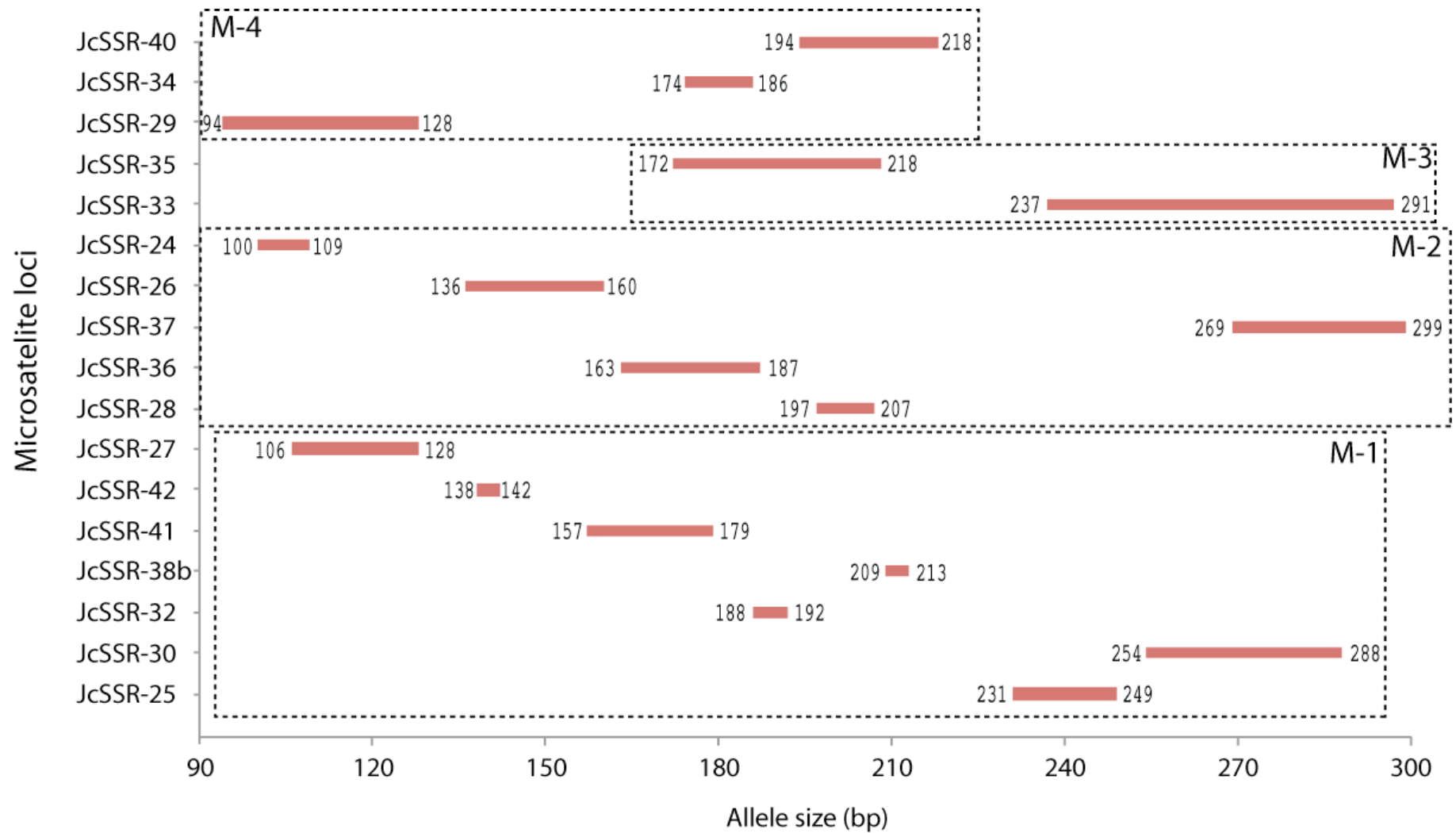


**Table 3.2** Characteristics of 20 GSS-derived microsatellites for *Jatropha curcas*<sup>1</sup>.

Marker name		Ta (°C)	Size range (bp)	A <sup>2</sup>	He <sup>3</sup>	Ho <sup>4</sup>	HWE <sup>5</sup>	Fis <sup>6</sup>	PIC <sup>7</sup>
JcSSR-24	F: CGCTGTAGGAATGGCATGTT R: CAAGCAATCATTCTCTCTTTCTTTT	60	100-109	4	0.691	0.714	0.0040	-0.033	0.625
JcSSR-25	F: CTTGGTGTGGGCTTACATT R: GGTCACAGCACTAGGAACTGA	62	231-249	4	0.698	0.592	0.2563	0.152	0.630
JcSSR-26	F: AATCTACTATCCCGCATGAA R: TCCTACTCTTTCTCCATTCTGT	58	136-160	6	0.791	0.689	0.8493	0.129	0.751
JcSSR-27	F: CTGCATCTGGGAAACAAAT R: ATAACACCCATGCCTATCAA	57	106-128	4	0.430	0.364	0.0878	0.153	0.390
JcSSR-28	F: TATGCAAGTACGGTTGTGTA R: CAGCTAATTCTTGGTTATGG	57	197-207	5	0.611	0.531	0.0053	0.132	0.556
JcSSR-29	F: AAAATAGAAAATAAACTCGCTCAAA R: CAATGTATTGTATGGTTTGAATTA	56	94-128	13	0.876	0.794	0.0087	0.093	0.848
JcSSR-30	F: GTGCGCCCAATGAAAA R: ATGGGGTTGCCAGGG	57	254-288	7	0.805	0.750	0.4681	0.069	0.768
JcSSR-31	F: ATTTGATTGATTGCCCGAC R: GCAGCACCTCCCCTAAAA	59	114	1	-	-	-	-	-
JcSSR-32	F: TCTTTTGACTACCCAATGACCA R: TCGTGCTAGAGTTGGTTGAAAT	60	186-192	4	0.644	0.563	0.5595	0.126	0.565
JcSSR-33	F: GAGAACGTGGAGATTAATA R: TGGATGGATCATTGTCTG	55	237-297	16	0.906	0.778	0.9576	0.142	0.886
JcSSR-34	F: CTAAGTTTGGACATTTTAC R: TTAATGGAAGCACTCCTGTAAT	55	174-186	4	0.118	0.082	0.1529	0.311	0.114
JcSSR-35	F: GAGTTTGGTTGGATGGATA R: TAGAACCGCAGCAGAAA	54	172-208	10	0.889	0.769	0.9896	0.135	0.856
JcSSR-36	F: GCACTCAAAAGTGTTCCTCAA R: ATCACACCAAAGAAGATGCAG	59	163-187	4	0.699	0.636	0.9487	0.090	0.620
JcSSR-37	F: TGCAGGCACACCAAACAA R: TTTTCGATGGAATCTAGGTTAGTCA	58	269-299	11	0.873	0.761	0.0000 *	0.128	0.847
JcSSR-38	F: TGAAGCTGTCTTTGATTGAGGAA R: TCTTGGGATCGTCTACAAGGTCT	61	209-213	3	0.521	0.469	0.2779	0.098	0.431
JcSSR-38b	F: ATCAGCAACTCCTTAATGCCAA R: CAACTCAAAAGTTCAGCCCAAA	59	153-157	3	0.537	0.461	0.2991	0.081	0.441
JcSSR-39	F: TTTTAAACATATTGGGTTGAATTTT	58	115	1	-	-	-	-	-

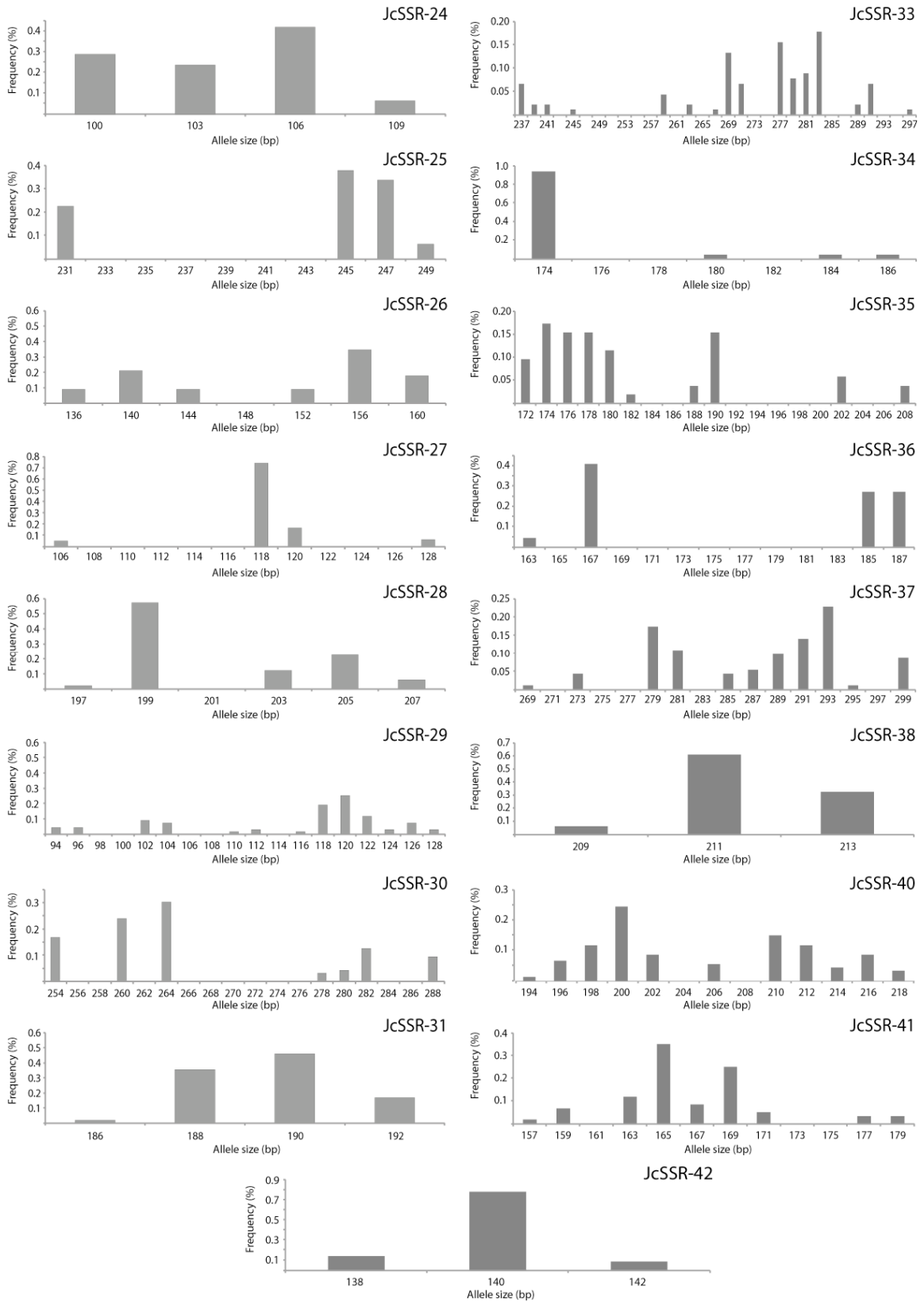
JcSSR-40	R: TTTTGCATAAATAACAGAAGGT F: AGTGGTGGTTGTGCTCATAGTG R: GTGGGTCACGCTATCCATATCT	61	194-218	11	0.877	0.723	0.1786	0.175	0.853
JcSSR-41	F: GTACGAGCGTGGACTAACT R: GACATTACAAATATTTTGAACG	52	157-179	9	0.800	0.700	0.9525	0.125	0.758
JcSSR-42	F: TGCATCAACACATCCATTCTTT R: GAGTGGGAAGTAGCATTGGAA	57	138-142	3	0.375	0.298	0.0379	0.206	0.338

\* Significant at 5% significance level ( $p > 0.0029$ ). <sup>1</sup> 49 samples genotyped; <sup>2</sup> number of alleles at each locus; <sup>3</sup> expected heterozygosity; <sup>4</sup> observed heterozygosity; <sup>5</sup> deviation from Hardy-Weinberg equilibrium ; <sup>6</sup> inbreeding coefficient; <sup>7</sup> polymorphic information content.



**Figure 3.1** Distribution of microsatellite loci in *Jatropha curcas*. Loci are grouped by repeat length for provisional multiplex PCRs.

**Figure 3.2** Distributions of allele frequencies at the 17 polymorphic *microsatellite* loci in *J. curcas* populations.



## **Acknowledgements**

This study was supported by the Brazilian Government, the Brazilian Ministry of Science and Technology (MCT) through an FINEP grant (BRJATROPHA Project), The Bank of Northeastern Brazil (BNB/ETENE/FUNDECI) and the Brazilian Agricultural Research Corporation (Embrapa).

## References

- ABDEL-HAMID, HF. Molluscicidal and in-vitro schistosomicidal activities of the latex and some extracts of some plants belonging to Euphorbiacea. **J. Egypt. Soc. Parasitol.** v.33, p.947–954, 2003.
- AMOS, WA. Comparative approach to the study of microsatellite evolution. In: *Microsatellites; Evolution and Applications*, Goldstein DB, Schlotterer C, eds., **Oxford University Press**, Oxford, p. 67–79, 1999.
- ARRUDA, FP; BELTRÃO, NEM; ANDRADE, AP; PEREIRA, WE; SEVERINO, LS. Cultivo de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) como alternativa para o semi-árido nordestino. **Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibrosas.** v.8, n.1, p.789-799, 2004.
- BERCHMANS, HJ; HIRATA, S. Biodiesel production from crude *Jatropha curcas* L. seed oil with a high content of free fatty acids. **Bioresour. Technol.** v.99, p. 1716–1721, 2008.
- BOTSTEIN, D; WHITE, RL; SKOLMICK, H. et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. **Am. J. Human Gen.**, v.32, p.314–331, 1980.
- CASTELO, A; MARTINS, W; GAO, G. Troll - Tandem Repeat Occurrence Locator. **Bioinformatics**, v.18, p.634–636, 2002.
- CORTESÃO, M. Culturas tropicais: plantas oleaginosas. Lisboa: **Clássica**, 231p, 1956.
- DEWOODY, JÁ; HONEYCUTT, RL; SKOW, LC. Microsatellite markers in white-tailed deer. **J. Hered.**, v. 86, p. 317-319, 1995.
- EMEASOR, KC; OGBUJI, RO; EMOSAIRUE, SO. Insecticidal activity of some seed powders against *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae) on stored cowpea. Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz - **Journal of Plant Diseases and Protection**, v.112, n.1, p. 80–87, 2005.
- FAIRLESS, D. Biofuel: the little shrub that could—maybe. **Nature**, v.449, p. 652-655, 2007.

- GOUDET, J. Fstat: a computer program to calculate F-statistics. **J. Hered**, v.86, p.485–486, 1995.
- HANCOCK, JM. Microsatellites and other simple sequence: Genomic context and mutational mechanisms. In: GOLDSTEIN, D.B.; SCHLOTTERER, C. (eds.) *Microsatellites: Evolution and Applications*. **Oxford University Press**, Ney York, 368p., 1999.
- KALINOWSKI, ST; TAPER, ML; MARSHALL, TC. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. **Mol Ecol**, v.16, p. 1099–1006, 2007.
- Lakshmanan P, Mohan S, Jeyarajan R. Antifungal properties of some plant extracts against *Thanatephorus cucumeris*, the causal agent of collar rot disease of *Phaseolus aureus*. **Madras Agricultural Journal**, v.77, p.1-4, 1990.
- MARSHALL, TC; SLATE, J; KRUIK, LEB; PEMBERTON, JM. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. **Mol Ecol**, v.7, p.639–655, 1998.
- NAMBISAN, P. Biotechnological intervention in jatropha for biodiesel production. **Current Science**, v.93, n.10, p. 1347-1348, 2007.
- NAZARENO, AG; DOS REIS, MS. The same but different: monomorphic microsatellite markers as a new tool for genetic analysis. **Am J Bot**, v.98, n.10, p. 265–267, 2011.
- PEIXOTO, AR. *Plantas oleaginosas arbóreas*. São Paulo: **Nobel**, 284p, 1973.
- RAYMOND, M; ROUSSET, F. GENEPOP, Version 1.2: Population genetics software for exact tests and eucumenicism. **J. Hered**, v.86, p.248-249, 1995.
- ROZEN, S; SKALETSKY, HJ. Primer3 on the WWW for general users and biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S. (Ed.). *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*, Humana Press, Totowa, USA: **Human Press**, p.365–386, 2000.

SATO, S; HIRAKAWA, H; ISOBE, S. et al. Sequence analysis of the genome of an oil-bearing tree, *Jatropha curcas* L. **DNA Res.** v.18, n.1, p. 65-76, 2011.

SCHLOTTERER, C; WIEHE, T. Microsatellites, a neutral marker to infer selective sweeps. In: Goldstein, D.B.; Schlotterer, C. (eds.) *Microsatellites: Evolution and applications.* **Oxford University Press**, Ney York, 368p, 1999.

VAN OOSTERHOUT, C; HUTCHINSON, WF; WILLS, DPM; SHIPLEY, P. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. **Mol Ecol Notes**, v.4, p.535–538, 2004.



## **7. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

O desenvolvimento de marcadores moleculares microssatélites (SSR), tanto através do isolamento direto do genoma e construção de bibliotecas genômicas com enriquecimento duplo, quanto pela restauração de sequências do Genomic Survey Sequences (GSS – GENBANK) resultou na obtenção de marcadores altamente polimórficos capazes de serem usados para estimar a variabilidade genética e os processos populacionais da *Jatropha curcas*.

## 8. REFERÊNCIAS

ALKIMIM, E. R.; SOUSA, T. S.; SOARES, B. O.; SOUZA, D. A.; JUHÁSZ, A. C. P.; NIETSCHKE, S.; COSTA, M. R. Genetic diversity and molecular characterization of physic nut genotypes from the active germplasm bank of the agricultural research company of Minas Gerais, Brasil. **African Journal of Biotechnology**, v. 12, n. 9, p. 907-913, 2013.

ALLARD, R. W. Princípios do melhoramento genético das plantas. **Edgard Blucher**, 381p., 1970.

AMBROSI, D. G.; GALLA, G.; PURELLI M.; BARBI, T.; FABBRI, A.; LUCRETTI, S.; SHARBEL, T. F.; BARCACCIA, G. DNA markers and FCSS analyses shed light on the genetic diversity and reproductive strategy of *Jatropha curcas* L. **Diversity**, v. 2, p. 810-836, 2010.

ISLAM, A.; YAAKOB, Z.; ANUAR, N.; PRIMANDARI, S.; OSMAN, M. Physiochemical properties of *Jatropha curcas* seed oil from different origins and candidate plus plants (CPPs). **J. Am. Oil Chem. Soc.**, v.89 p. 293-300, 2012.

AREGHEORE, E. M.; BECKER, K.; MAKKAR, H. P. S. Detoxification of a toxic variety of *Jatropha curcas* using heat and chemical treatments, and preliminary nutritional evaluation with rats. **South Pacific Journal of Natural Science**, v.21, p. 50-56, 2003.

AROLU, I. W.; RAFII, M. Y.; HANAFI, M. M.; MAHMUD, T. M. M.; LATIF, M. A. Molecular characterization of *Jatropha curcas* germplasm using inter simple sequence repeat (ISSR) markers in Peninsular Malaysia. **Australian Journal Crop Science**, v. 6, n. 12, 1666-1673, 2012.

ARRUDA, F. P.; BELTÃO, N. E.; ANDRADE, A. P.; PEREIRA, W. E.; SEVERINO, L. S. Cultivo de Pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) como alternativa para o semi-árido nordestino. **Rev. Brasil. Fibros.**, v. 8, p. 789-799, 2004.

BALDWIN, B. G. Phylogenetic utility of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA in plants: an example from the compositae. **Mol. Phyl. Evol**, v. 1, p. 3–16, 1992.

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. germoplasm 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.

BECERRA, V.; GEPTS, P. RFLP diversity of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in its centres of origin. **Genome**, v. 37, p. 253-263, 1994.

BECERRA, V. V.; PAREDES, M. C. Uso de marcadores bioquímicos y moleculares en estudios de diversidad genética. **Agric. Téc.**, v. 60, n. 3, p. 1-8, 2000.

BEHERA, S. K.; SRIVASTAVA, P.; TRIPATHI, R.; SINGH, J. P.; SINGH, N. Evaluation of plant performance of *Jatropha curcas* L. under different agro-practices for optimizing biomass – a case study. **Biomass and Bioenergy**, v. 34, p. 30-41, 2010.

BISSE, J. Árboles de Cuba. **Editorial Científico-Técnica**, 154p, 1988.

BOMFIM-GÓIS, I. B.; SILVA, R.; BOARI, A. J.; SANTOS-OLIVEIRA, A.; FRAGA, A. C. Caracterização isoenzimática de acessos de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.). In: II Congresso Brasileiro de Mamona (*Ricinus communis*) – **EMBRAPA**, 2006.

BOTSTEIN, D.; WHITE, R. L.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R. V. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **Am. J. Hum Genet.**, v. 32, p. 314-331, 1980.

BRAMMER, S. P. Variabilidade e diversidade genética vegetal: requisito fundamental em um programa de melhoramento. **EMBRAPA**, 9p, 2002.

BRASIL. Casa Civil da Presidência da República. A viabilidade de utilização de óleo vegetal – biodiesel como fonte alternativa de energia (relatório final). **Imprensa Oficial** 15p, 2003.

BRASIL. Grupo de Trabalho Interministerial. Diretrizes de política de agroenergia. **Imprensa Oficial**, 34p, 2005.

BRESSAN, E. de A.; SCOTTON, D. C.; FERREIRA, R. R.; JORGE, E. C.; SEBBENN, A. M.; GERALD, L. T. S.; FIGUEIRA, A. Development of microsatellite primers for *Jatropha*

*curcas* (Euphorbiaceae) and transferability to congeners. **American Journal of Botany**, v. 99, p. 237-239, 2012.

CAI, Y.; SUN, D.; WU, G.; PENG, J. ISSR-based genetic diversity of *Jatropha curcas* germplasm in China. **Biomass and Bioenergy**, v. 34, p.1239-1250, 2010.

CASTELLANELLI, M.; SOUZA, S. N. M.; SILVA, S. L.; KAILER, E. K. Desempenho de motor ciclo diesel em bancada dinamométrica utilizando misturas diesel/biodiesel. **Eng. Agríc**, v. 28, p. 145-153, 2008.

CONDIT, R.; HUBBELL, S. P. Abundance and DNA sequence of two-base repeat regions in tropical tree genome. **Genome**, v. 34, p. 66-71, 1991.

CONTRAN, N.; CHESSA, L.; LUBINO, M.; BELLAVITE, D.; ROGGERO, P. P.; ENNE, G. State-of-the-art of the *Jatropha curcas* productive chain: From sowing to biodiesel and by-products. **Industrial Crops and Products**, v. 42, p. 202-215, 2013.

DANNI-OLIVEIRA, I. M. Air pollution as a cause of morbidity and mortality of the urban population. **RA'E GA**, n. 15, p. 113-125, 2008.

DESHWALL, R. P. S.; SINGH, R.; MALIK, K.; RANDHAWA, G. J. Assessment of genetic diversity and genetic relationships among 29 populations of *Azadirachta indica* using RAPD markers. **Genet Resour Crop Evol**, v. 52, p. 285-292, 2005.

DIAS, L. A. S.; MISSIO, R. F.; DIAS, D. C. F. S. Antiquity, botany, origin and domestication of *Jatropha curcas* (Euphorbiaceae), a plant species with potencial for biodiesel production. **Genetic and Molecular Research**, v. 11, n. 3, p. 2719-2728, 2012.

DINIZ, F. M.; MACLEAN, N.; PATERSON, I. G.; BENTZEN, P. Polymorphic tetranucleotide microsatellite markers in the Caribbean spiny lobster, *Panulirus argus*. **Mol. Ecol. Notes**, v.4, p. 327-329, 2004.

DINIZ, F. M.; MACLEAN, N.; OGAWA, M.; PATERSON, I. G.; BENTZEN, P. Microsatellites in the overexploited spiny lobster, *Panulirus argus*: isolation, characterization of loci and potential for intraspecific variability studies. **Cons. Gen**, v. 6, p. 637-641, 2005.

DINIZ, F. M.; IYENGAR, A.; LIMA, P. S. C.; MACLEAN, N.; BENTZEN, P. Application of a double-enrichment procedure for microsatellite isolation and use of tailed primers for high throughput genotyping. **Gen. Mol. Biol**, v. 30, p. 380-384, 2007.

DIVAKARA, B. N.; UPADHYAYA, H. D.; WANI, S. P.; LAXMIPATHI GOWDA, C. L. Biology and genetic improvement of *Jatropha curcas* L.: A review. **Applied Energy**, 2009. doi: 10.1016/j.apenergy.2009.07.013.

DURÕES, F. O. M.; LAVIOLA, B. G.; SUNDFELD, E.; MENDONÇA, S.; BHERING, L. L. Pesquisa, desenvolvimento e inovação em pinhão-mansão para produção de biocombustíveis. **Embrapa Agroenergia**, 17p, 2009.

ESCOBAR, J. C.; LORA, E. S.; VENTURINI, O. J.; YÁÑEZ, E. E.; CASTILLO, F.; ALMAZAN, O. Biofuels; Environment, technology and food security. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 13, p. 1275-1287, 2009.

FAIRLESS, D. Biofuel: the little shrub that could - maybe. **Nature**, v. 449, p. 652-655, 2007.

FUTUYMA, D. J. Evolutionary biology. **Sinauer Associates**, 763p., 2006.

GERPEN, J. V. Biodiesel processing and production. **Fuel Processing Technology**, v. 86, p. 1097-1107, 2005.

GOLDEMBERG, J. Biomass and Energy. **Quim Nova**, v. 32, n. 3, p. 582-587, 2009.

GOONASEKERA, M. M.; GUNAWARDANA, V. K.; JAYASENA, K.; MOHAMMED, S. G.; BALASUBRAMANIAM, S. Pregnancy terminating effect of *Jatropha curcas* in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 47, p. 117-123, 1995.

GUPTA, P. K.; VARSHNEY, R. K. The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with emphasis o bread wheat. **Euphytica**, v. 113, p. 163-185, 2000.

GUPTA, P. K.; VARSHNEY, R. K.; SHARMA, P. C.; RAMESH B. Molecular markers and their applications in wheat breeding. **Plant breeding**, v. 118, p. 369-390, 1999.

- HEARNE, C M.; GHOSH, S.; TODD, J. A. Microsatellites for linkage analysis of genetic traits. **Trends in Genetics**, v. 8, p. 288-294, 1992.
- HEID, C. A.; STEVENS, J.; LIVAK, K. J.; WILLIAMS, P. M. Real time quantitative PCR. **Genome Res.**, v. 6, p. 986-994, 1996.
- HELLER, J. Physic nut (*Jatropha curcas* L.). **International Plant Genetic Resource Institute**, 66p, 1996.
- HITTALMANI, S.; PARCO, A.; MEW, T. V. Fine mapping and DNA marker-assisted pyramiding of the three major genes for blast resistance in Rice. **Theoretical and Genetics**, v. 100 p. 1121-1128, 2000.
- ISLAM, A. K. M. A.; YAAKOB, Z.; ANUAR, N. Jatropha: A multipurpose plant with considerable potencial for the tropics. **Scientific Research and Essays**, v. 6 n. 13, p. 2597-2605, 2011.
- ISLAM, A. K. M. A.; YAAKOB, Z.; ANUAR, N.; PRIMANDARI, S.; OSMAN, M. Physiochemical properties of *Jatropha curcas* seed oil from different origins and candidate plus plants (CPPs). **J. Am. Oil Chem. Soc.**, v.89 p. 293-300, 2012.
- JONGSCHAAP, R. Germoplasm collection. In: Proceeding of FACT seminar, *Jatropha curcas*, agronomy and genetics. Disponível em [www.fact-fuels.org](http://www.fact-fuels.org). acessado em 20 de março de 2013.
- KANG, S.; JAWORSKI, A.; OHSHIMA, K.; WELLS, R. D. Expasion and delection of CTG repeats from human disease genes are determined by the direction of replication in *E. coli*. **Nature Genetics**, v.10, p. 213-218, 1995.
- KATEMBO, B. I.; GRAY P. S. Africa, seeds biofuel. **J. Multidisciplinary Res**, v. 1, p. 1-6, 2007.
- KEPHART, S. R. Starch gel eletrophoresis of plant isozymes: A comparative analysis of techniques. **Amer. J. Bot.**, v. 77, n. 5, p. 693-712, 1990.
- KHURANA-KAUL, V.; KACHHWAHA, S.; KOTHARI S. L. Characterization of diversity in *Jatropha curcas* L. germoplasm using RAPD and ISSR markers. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 11, p. 54-61, 2012.

- KIJAS, J. M.; FOWLER, J. C.; GARBETT C. A.; THOMAS M. R. Enrichment of microsatellites from the citrus genome using biotinylated oligonucleotide sequences bound to streptavidin coated magnetic particles. **Biotechniques**, v. 16, p.656-662, 1994.
- KING, A. J.; HE, W.; CUEVAS, J. A.; FREUDENBERGER, M.; RAMIARAMANANA, D.; GRAHAM, I. A. Potencial of *Jatropha curcas* as a source of renewable oil and animal feed. **Journal of Experimental Botany**, v. 60, n. 10, p. 2897-2905, 2009.
- KUMAR, A.; SHARMA S. An evaluation of multipurpose oil seed crop for industrial uses (*Jatropha curcas* L): a review. **Industrial Crops and Products**, v. 28, p. 1-10, 2008.
- LAVIOLA, B. G.; BHERING, L. L.; MENDONÇA, S.; ALBRECHT, J. C.; ROSADO, T. B.; MARANA, J. C.; RIBEIRO, J. A. A. Caracterização morfoagronômica do banco de germoplasma de pinhão manso: Resultados do 1º ano de avaliação. **Embrapa Agroenergia**, 8p, 2010
- LAVIOLA, B. G.; MENDONÇA, S.; RIBEIRO, J. A. A. Caracterização de acessos de pinhão manso quanto a toxidez. In: IV Congresso Brasileiro de Mamona e I Simpósio Internacional de Oleaginosas Energéticas. Anais. **Embrapa Algodão**, 2010.
- LINDFELDT, E. G.; WESTERMARK, M. O. Biofuel production with CCS as a strategy for creating a CO<sub>2</sub>-neutral road transport sector. **Energ. Procedia**, v. 1, p. 4111-4118, 2009.
- MAGGIONI, R.; ROGERS, A. D. Microsatellite primers for three Western Atlantic *Farfantepenaeus* prawn species. **Mol. Eco**, v. 2, p. 51-53, 2002.
- MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K.; SPORER, F.; WINK, M. Studies on nutritive potential and toxic constituents of different provenances of *Jatropha curcas*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p. 3152-3157, 1997.
- MAKKAR, H. P. S.; FRANCIS, G.; BECKER K. Protein concentrate from *Jatropha curcas* screw-pressed seed cake and toxic and antinutricional factors in protein concentrate. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 88, p. 1542-1548, 2008.
- MARROQUIN, E. A.; BAINCO, J. A.; GRANADOS, S.; CACERES, A.; MORALES, C. Clinical Trial of *Jatropha curcas* sapin treatment of common warts. **Fitoterapia**, v. 68, p. 160-162, 1997.

MARTIN, G.; MAYEUX A. Reflections on oil crops as sources of energy. 2 - Curcas oil (*Jatropha curcas*): A possible fuel. **Oleagineux**, v. 39, n. 5, p. 283-287, 1984.

MARTIN, J. M.; TALBERT, L. E.; LANNING, S. P.; BLAKE N. K. Hybrid performance in wheat as related to parental diversity. **Crop Science**, v. 35, p. 104-108, 1995.

MAY, B. Starch gel electrophoresis of allozymes. In: Molecular genetic analysis of populations: a practical approach. **Oxford University**, p. 1-27, 1992.

MELO, J. C.; BRANDER, W.; CAMPOS, R.; PACHECO, J.; SCHULER, A.; STRAGEVITCH, I. Avaliação preliminar do potencial o pinhão manso para a produção de biodiesel. In: **Anais do I Congresso Brasileiro de Tecnologia do Biodiesel**, p.198-203, 2006.

MINISTÉRIO DESENVOLVIMENTO AGRÁRIO. Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel, 2012. Disponível em [www.mda.gov.br/biodiesel](http://www.mda.gov.br/biodiesel), acessado em 29 de Março de 2013 às 15:21:07.

MOHHIBE, A. M.; AMTUL, W.; NAHAR, N. M. Prospects and potencial of fatty acid methyl esters of some non-traditional seed oils for use as biodiesel in India. **Biomass Bioenergy**, v. 29, p. 293-302, 2005.

MORGANTE, M.; OLIVIERI, A. M. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. **The Plant Journal**, v. 3, n. 1, p. 175-182, 1993.

NAIK, S. N.; GOUD, V. V.; ROUT, P. K.; DALAI A. K. Production of first and second generation biofuels: A comprehensive review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, p. 576-597, 2010.

NOOR CARMELLIA, N. A.; THOHIRAH LEE, A.; ABDULLAH, N. A. P. Genetic relationships and diversity of *Jatropha curcas* accessions in Malaysia. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 13, p. 3048-3054, 2012.

OLIVEIRA, E. J.; PÁDUA, J. G.; ZUCCHI, M. I.; VENCOVSKY, R.; VIEIRA, M. L. C. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genet. Mol. Biol.**, v. 29, n. 2, p. 294-307, 2006.



- OPENSHAW, K. A review of *Jatropha curcas*: an oil plant of unfulfilled promise. **Biomass and Bioenergy**, v. 19, p. 1-15, 2000.
- OVANDO-MEDINA, I.; ESPINOSA-GARCIA, F. J.; NÚÑEZ-FARFÁN, J. S.; SALVADOR-FIGUEROA, M. State of the art of genetic diversity research in *Jatropha curcas*. **Scientific Research and Essays**, v. 6, n. 8, p. 1709-1719, 2011.
- PAMIDIMARRI, D. V. N. S.; SINGH, S.; MASTAN, S. G.; PATEL, J.; REDDY, M. P. Molecular characterization and identification of markers for toxic and non-toxic varieties of *Jatropha curcas* L. using RAPD, AFLP and SSR markers. **Mol. Biol. Rep.**, v. 36, p. 1357-1364, 2009.
- PARAWIRA, W. Biodiesel production from *Jatropha curcas*: A review. **Scientific Research and Essays**, v. 5, n. 14, p.1796-1808, 2010.
- PAREDES, M.; GEPTS P. Extensive introgression of middle American germplasm into Chilean commo bean. **Gen. Res. and Crop Evo**, v. 42, p. 29 - 41, 1995.
- PATERSON, A. H.; TANKSLEY, S. D.; SORRELLS, M. E. Dna markers in plant improvement. **Advances in Agronomy**, v. 46, p. 39-90, 1991.
- PEIXOTO, A. R. Plantas oleaginosas arbóreas. **Nobel**, 284p, 1973.
- PETTERSSON, K.; HARVEY S. CO2 emission balances for different black liquor gasification biorefinery concepts for production of electricity or second-generation liquid biofuels. **Energy**, v.35, p. 1101-1106, 2010.
- PINILLA, J. A. G.; CAMPUZANO, L. F.; ROJAS S.; PANCHON-GARCIA, J. Caracterización morfológica y agronômica de la colección nacional de germoplasma de *Jatropha curcas* L.. **Orinoquia**, v. 15, n. 2, p. 131-147, 2011.
- POMPELLI, M. F.; JARMA, A. J.; OLIVEIRA, M. T.; RODRIGUES, B. R. M.; BARBOSA, M. O.; SANTOS, M. G.; OLIVEIRA, A. F. M.; ALMEIDA-CORTEZ, J. S. Crise energética mundial e o papel do Brasil na problemática de biocombustíveis. **Agronomia Colombiana**, v. 29, p. 231-240, 2011.
- QUELLER, D. C.; STRASSMAN, J. E.; HUGHES C. R. Microsatellites and kinship. **Trends Ecol. Evolut.**, v. 8, p. 285-288, 1993.

- RANADE, S. A.; SRIVASTAVA, A. P.; RANA, T. S.; SRIVASTAVA, J.; TULI, R. Easy assessment of diversity in *Jatropha curcas* L. plants using two single-primer amplification reaction (SPAR). **Biomass Bioenergy**, v. 32, p.533-540, 2008.
- RICCI, A.; CHEKHOVSKLY, K.; AZHAGUVEL, P.; ALBERTINI, E.; FALCINELLI, M.; SAHA, M. Molecular characterization of *Jatropha curcas* resources and identification of population-specific markers. **Bioenergy Research**, v. 5, p. 215-224, 2012.
- ROSADO, T. B.; LAVIOLA, B. G.; FARIA, D. A.; PAPPAS, M. R.; BHERING, L. L.; QUIRINO B.; GRATTAPAGLIA, D. Molecular markers reveal limited genetic diversity in a large germoplasm collection of the biofuel crop *Jatropha curcas* L. in Brazil. **Crop Science**, v. 50, p. 2373-2382, 2010.
- SACHS, I. A revolução energética do séc. XXI. **Estudos Avançados**, v. 59, p. 21-28, 2007.
- SCANDALIOS, J. G. Genetic control of multiple molecular forms of enzymes in plants: A review. **Biochemical Genetics**, v. 3, p. 37-79, 1969.
- SCHUCHARDT, U.; SERCHELI, R.; VARGAS, R. M. Transesterification of vegetable oils: a review. **J. Braz. Chem. Soc**, v. 9, n. 1, p. 199-210, 1998.
- SENTHIL KUMAR, R.; PARTHIBAN, K. T.; GOVINDA RAO, M. Molecular characterization of *Jatropha* genetic resources through inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. **Mol Biol Rep**, v. 36, p. 1951-1956, 2009.
- SHARMA, S.; DHAMIJA, H. K.; PARASHAR, B. *Jatropha curcas*: A review. **Asian J. Pharm. Sci.**, v. 2, p. 107-111, 2012.
- SHEN, JL.; JIA, XN.; NI, HQ.; SUN, PG.; NIU, SH.; CHEN, XY. AFLP analysis of genetic diversity of *Jatropha curcas* grown in Hainan, China. **Trees**, v. 24, p. 455-462, 2010.
- SILVA, S. G. A.; SILVA, F. K. G.; DINIZ, A. L.; ARRIEL, N. H. C. Caracterização da diversidade de acessos de pinhão manso. In: **III Congresso de Mamona – energia e ricinoquímica**, Embrapa Algodão, 2008.
- SINGH, P.; SINGH, S.; MISHRA, S. P.; BHATIA, S. K. Molecular characterization of genetic diversity in *Jatropha curcas* L. **Genes, Genomes and Genomics**, v. 4, p. 1-8, 2010.

- SINHA, P.; TRIPATHI, S. B. Molecular characterization of *Jatropha* genetic resources through amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers. **International Journal of ChemTech Reserch**, v. 5, n. 2, p. 735-740, 2013.
- SIREGAR, F.; SOERONO AKBAR, S. M. *Jatropha curcas* látex inhibits the realease of collagenase by gingival fibroblast. **Medical Journal of Indonesia**, v. 16, n. 4, p. 219-223, 2007.
- SMITH, J. S. C.; SMITH, O. S. Fingerprinting crop varieties. **Advances in Agronomy**, v. 47, p. 85-140, 1992.
- SUN, QB.; LI, LF.; LI, Y.; WU, GJ.; GE, XJ. SSR and AFLP markers reveal low genetic diversity in the biofuel plant *Jatropha curcas* in China. **Crop Sci**, v. 48, p. 1865-1871, 2008.
- SURWENSHI, A.; KUMAR, V.; SHANWAD, U. K.; JALAGERI, B. R. Critical review of diversity in *Jatropha curcas* for crop improvement: A candidate biodiesel crop. **Research Journal of Agricultural Sciences**, v. 2, n. 2, p. 193-198, 2011.
- TEWARI, J. P.; SHUKLA, I. K. Inhibition of infectivity of two strains of watermelon mosaic virus by latex of some angiosperms. **GEObIOS**, V. 9, P. 124-126, 1982.
- THOMAS, R.; SAH, N. K.; SHARMA, P. B. Therapeutic biology of *Jatropha curcas*: A mini review. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 9, p.315-324, 2008.
- TIWARI, A. K.; KUMAR, A.; RAHEMAN, H. Biodiesel production from *Jatropha* (*Jatropha curcas*) with high free fatty acids: an optimized process. **Biomass and Bioenergy**, v. 31, p. 569-575, 2007.
- TORAL, O. C.; IGLESIAS, J. M.; MONTES DE OCA, S.; SOTOLONGO, J. A.; GARCIA, S.; TORSTI, M. *Jatropha curcas* L., una especie arbórea con potencial energético en Cuba. **Pastos y Forrajes**, v. 31, n. 3, p. 191-207, 2008.
- TORRES, A. M.; SOOST, R. K.; DIEDENHOFEN, U. Leaf isozymes as genetic markers in citrus. **Amer. J. Bot.**, v. 65, n. 8, p. 869 – 881, 1978.
- TORRES, C. *Jatropha curcas*: desarrollo fisiológico y técnico. In: **Boletín CUBAENERGÍA**. Centro de Gestión de la Información y Desarrollo de la Energía, 2007. Disponivel em: [www.cubaenergia.cu](http://www.cubaenergia.cu). Acessado em 27 de março de 2013.

VARSHNEY, R. K.; GRANER, A.; SORRELLS, M. E. Genic microsatellite markers in plants: features and applications. **Trends Biotechnol**, v. 23, p. 48–55, 2005.

VAVILOV, N. I. Studies on the origin of cultivated plants. **Institute of Applied Botany and Plant Breeding**, 78p, 1926.

VERRASTRO, F.; LADISLAW S. Providing energy security in an interdependent *world*. **The Washington Quarterly**, v. 30, n.4, p. 95-104, 2007.

VIJAYANAND, V.; SENTHIL, N.; VELAIKUMAR, S.; PARAMATHMA, M. Genetic diversity of Indian *Jatropha* species as revealed by morphological and ISSR markers. **J. Crop Sci. Biotech**, v. 12, n. 3, p. 115-120, 2009.

VOGUEL, J. M.; POWELL, W.; RAFALSKI, A.; MORGANTE, M.; TUDO, J. D.; TARAMINO, G.; BIDDLE, P.; HANAFEY, M.; TINGLE, S. V. Application of genetic diagnosis to plant genome analysis: comparison of marker systems. **App. Biotechnol. Tree Cult**, v. 1, p. 119-124, 1994.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; VAN DE LEE, T.; HORNES, M.; FRIGTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KULPE, M.; ZABEAU, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Res.**, v. 23, p.4407-4414, 1995.

WARRIER, R. R.; PRIYADHARSHINI, P.; VADIVU, S. S.; DEVIKA NAGALAKSMI, B.; SAVITHA, C.; ANANDALAKSHMI, R.; NICODEMUS, A.; GURUDEV SINGH, B. Isozyme polymorphism to detect genetic diversity of *Jatropha curcas* (L.) in India. **Annals of Tropical Research**, v. 32, p. 92-111, 2010.

WIEBE, K.; CROPPENSTEDT, A.; RANEY, T.; SKOET, J.; ZUREK, M.; TSCHIRLEY, J.; CLUFF, M. The state of food agriculture 2008. Biofuels: prospect, risks and opportunities. **FAO**, Rome, 2008.

WILLIAMS, K. G.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKY, J. A.; TINGEY, S. V. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acid Res**, v. 18, p. 6531-6533, 1990.

- XU, W.; MULPURI, S.; LIU, A. Genetic diversity in the *Jatropha* genus and its potential application. **CAB Reviews** v. 7, n. 59, p.1-15, 2012.
- YE, M.; LI, C. Y.; FRANCIS, G.; MAKKAR, H. P. S. Current situation and prospects of *Jatropha curcas* as a multipurpose tree in China. **Agroforestry Systems**, v. 76, p. 487-497, 2009.
- YU, Y. G.; SAGHAI MAROOF, M. A.; BUSS, G. R. RFLP and microsatellite mapping of a gene for soybean mosaic virus resistance. **Phytopathology**, v. 84, p. 60-64, 1996.
- YUSUF, A.; HANNA M. A. Alternative diesel fuels from vegetable oils. **Bioresource Technology**, v. 50, p. 153-163, 1995.
- ZHANG, Z.; GUO, X.; LIU, B.; TANG, L.; CHEN, F. Genetic diversity and genetic relationship of *Jatropha curcas* between China and Southeast Asian revealed by amplified fragment length polymorphisms. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 15, p. 2825-2832, 2011.
- ZIETKIEWICZ, E.; RAFALSKI, A.; LABUNA, D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. **Genomics**, v. 20, p. 176-183, 1994.