



## Diversidade genética em pinhão manso com base em marcadores ISSR

Linda Brenna Ribeiro ARAÚJO<sup>1\*</sup>, Antônio Moreira BARROSO NETO<sup>1</sup>,  
Kátia Regina Alves PIRES<sup>2</sup>, Cândida Hermínia Campos de Magalhães BERTINI<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Fitotecnia), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil.

<sup>2</sup>Graduação em Agronomia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil.

<sup>3</sup>Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil.

E-mail: lindabrenna@gmail.com

Recebido em abril/2018; Aceito em setembro/2018.

**RESUMO:** A utilização de espécies oleaginosas constitui uma alternativa à busca crescente por biocombustíveis, fazendo com que o pinhão manso venha ganhando destaque pela qualidade do seu óleo e rusticidade. Surge assim uma demanda pelo desenvolvimento de cultivares desta espécie e para isso o conhecimento de sua variabilidade genética é fundamental. Objetivou-se com o presente estudo avaliar a diversidade genética de 23 acessos de pinhão manso coletados em diferentes regiões do Brasil. Os DNAs dos acessos foram extraídos e analisados por meio de 12 iniciadores ISSR. A partir dos perfis eletroforéticos das bandas foi gerada a matriz de dissimilaridade genética, utilizada na elaboração do dendrograma e no agrupamento dos indivíduos, que também foi realizado segundo o método de Tocher. O Índice de Coincidência foi calculado para verificar a existência de relação entre o agrupamento dos acessos e seu local de coleta. Um total de 44 bandas foram amplificadas, sendo 26 polimórficas (49,08%). As distâncias genéticas entre os genótipos variaram de 0,034 a 0,314. Os métodos de agrupamento permitiram a formação de grupos distintos, com um total de três grupos formados pelo Método de Tocher e sete pelo método UPGMA. Os acessos estudados apresentaram base genética estreita, o que poderá trazer dificuldades ao processo de melhoramento da cultura e levar a uma maior vulnerabilidade genética das novas cultivares lançadas.

**Palavras-chave:** *Jatropha curcas*, marcadores moleculares, diversidade genética.

## Genetic diversity in the physic nut based on ISSR markers

**ABSTRACT:** The use of oleaginous species is an alternative in the growing search for biofuels, where the physic nut (*Jatropha curcas*) stands out due to its robustness and the quality of its oil. The result is a demand to develop cultivars of this species, and for this, a knowledge of its genetic variability is fundamental. The aim of this study was to evaluate the genetic diversity of 23 accessions of jatropha collected in different regions of Brazil. The DNA of the accessions was extracted and analysed by means of 12 ISSR primers. A genetic dissimilarity matrix was generated from the electrophoretic profiles of the bands and used in elaborating the dendrogram and in grouping the individuals, which was also carried out as per the Tocher method. A Coincidence Index was calculated to check the existence of a relationship between the groups of accessions and their places of collection. A total of 44 bands were amplified, of which 26 were polymorphic (49.08%). The genetic distance between the genotypes ranged from 0.034 to 0.314. The clustering methods resulted in the formation of distinct groups, where three groups were formed by the Tocher Method and seven by the UPGMA. The accessions under study had a narrow genetic base, which could cause difficulties for the process of crop breeding, and lead to greater genetic vulnerability in the new cultivars.

**Keywords:** *Jatropha curcas*, molecular markers, genetic diversity.

### 1. INTRODUÇÃO

Fontes de energia limpas e renováveis são cada vez mais almeçadas, devido à poluição provocada pelos derivados do petróleo e à elevada demanda energética (REIS et al., 2015). Além disso, a utilização de fontes alternativas de combustível também pode auxiliar na geração de emprego e distribuição de renda (EVANGELISTA et al., 2015). Nesse sentido, a utilização de plantas oleaginosas ganha importância, trazendo benefícios ambientais e socioeconômicos, principalmente quando essas se adaptam a áreas de menor interesse agrícola, como as regiões semiáridas.

O pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) é uma planta da família Euphorbiaceae, perene, com potencial para a produção de óleo, sendo este adequado ao processo produtivo de

biodiesel (LAVIOLA et al., 2014). O óleo do pinhão manso destaca-se por apresentar baixa acidez e boa estabilidade quando comparado com os principais óleos vegetais, o que despertou o maior interesse pela espécie nos últimos anos (JAIN; SHARMA, 2010; Tapanes et al., 2008). No Brasil, o pinhão manso foi introduzido há séculos, mas os primeiros cultivos em larga escala com finalidades comerciais e acadêmicas se estabeleceram apenas na década de 1980 (ROSADO et al., 2010).

A espécie tem apresentado boa adaptação e potencial produtivo especialmente em países tropicais como o Brasil, Indonésia, China, Guatemala, México e Índia (CARELS, 2013; JAIN; SHARMA, 2010; RAPOSO et al., 2014; TREBBI et al., 2015). E o Brasil, especialmente, apresenta grande

potencial para a produção de biocombustíveis devido a alguns fatores como a sua grande extensão e a diversidade ambiental (DARCE, 2005). Ao se tratar de pinhão manso, a Região Nordeste do país se sobressai devido ao seu clima semiárido quente, que se tem mostrado favorável ao desenvolvimento da espécie. Além disso, o pinhão manso pode ser utilizado em consórcio com outras culturas, facilitando a implantação da espécie na região, gerando um melhor aproveitamento da terra e uma maior segurança ao produtor (DE SOUZA et al., 2013).

No entanto, existem muitos desafios tecnológicos para a utilização da espécie, pois o pinhão manso ainda se encontra em processo de domesticação, não havendo cultivares de alto desempenho agrônomico (OVANDO-MEDINA et al., 2013) ou mesmo sistemas de cultivo validados para as regiões produtoras no Brasil (LAVIOLA et al., 2014). Nessa problemática, a criação de coleções e bancos de germoplasma é muito importante para o processo de melhoramento da cultura. A caracterização dos acessos coletados deve ser realizada a fim de possibilitar sua utilização pelos melhoristas na obtenção de indivíduos com potencial para o posterior desenvolvimento de cultivares. O conhecimento da variabilidade genética e a sua caracterização são necessários à seleção de genótipos que se adaptem aos novos sistemas de produção (DIAS et al., 2015).

A caracterização molecular é uma importante ferramenta a ser utilizada, por permitir de forma rápida a obtenção de informações genéticas dos acessos selecionados (Silva, 2013). Com o crescente interesse pela espécie, a utilização ou o desenvolvimento de técnicas moleculares para o monitoramento e a seleção de pinhão manso tem grande relevância (Raposo et al., 2014).

A partir de marcadores moleculares dominantes como os ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats* – Sequências Internas Simples Repetidas) é possível estimar a dissimilaridade entre acessos, que é de grande importância em estudos de divergência genética (CRUZ, 2008; JUHÁSZ et al., 2013).

Além disso, ao selecionar genótipos divergentes, quando aliados ao desempenho agrônomico, aumentam-se as chances de ganhos com seleção (CRUZ, 2005).

As etapas de caracterização muitas vezes são tidas como programas de pré-melhoramento, os quais vêm sendo evidenciados como importantes estratégias para a formação de genótipos adaptados, resistentes e de melhor qualidade (Cruz et al., 2011). Devido a espécie ser perene, são necessários muitos estudos no que se diz respeito ao seu melhoramento e variabilidade genética (JUHÁSZ ET al., 2013).

Devido à grande extensão territorial do Brasil, o país apresenta muitas diferenças climáticas, o que leva a grandes variações ecológicas (BRASIL, 2017). Como o pinhão manso apresenta boa adaptação e ampla distribuição no território brasileiro, a coleção de germoplasma da Universidade Federal do Ceará reúne indivíduos de quatro macroregiões do Brasil (Norte, Nordeste, Centro Oeste e Sudeste), a fim de ter boa representatividade da espécie no país. Dessa forma, objetivou-se com este trabalho avaliar a diversidade genética de acessos de pinhão manso da coleção de germoplasma da Universidade Federal do Ceará, coletados em diferentes regiões do Brasil.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Material vegetal, seleção de iniciadores e extração de DNA

A diversidade genética entre 23 genótipos de pinhão manso, provenientes da coleção de germoplasma da Universidade Federal do Ceará, foi avaliada utilizando-se 12 iniciadores para marcadores ISSR (*Integrated DNA Technologies*). Dentre os genótipos selecionados, dez correspondem a acessos com bom desempenho produtivo e porte baixo quando avaliados em ensaio na região semiárida (acessos 1 a 10) (SILVA, 2013), e treze correspondem a genótipos de diferentes regiões do Brasil, mas sem dados de avaliação agrônomico (acessos 11 a 23) (Tabela 1).

Tabela 1. Identificação dos acessos de pinhão manso e respectiva origem geográfica.

Table 1. Identification of the *Jatropha* accessions and their respective geographical origins.

	Identificação	Acesso	Município - Estado	Região
Acessos de bom desempenho produtivo e porte baixo	1	JCCE 034	Crateús – CE	Nordeste
	2	JCCE 035	Crateús – CE	Nordeste
	3	JCCE 038	Crateús – CE	Nordeste
	4	JCCE 064	Parambu – CE	Nordeste
	5	JCCE 053	Parambu – CE	Nordeste
	6	JCCE 055	Parambu – CE	Nordeste
	7	JCCE 014	Quixadá – CE	Nordeste
	8	UFRRJFMI 002	Rio de Janeiro – RJ	Sudeste
	9	UFRRJFMI 346	Rio de Janeiro – RJ	Sudeste
	10	UFRRJFMI 874	Rio de Janeiro – RJ	Sudeste
Acessos sem informações morfoagronômicas	11	UFVJC 10	João Pinheiro – MG	Sudeste
	12	UFVJC 15	Veredas – MG	Sudeste
	13	UFVJC 18	Montalvânia – MG	Sudeste
	14	UFVJC 23	Caratinga – MG	Sudeste
	15	UFVJC 26	Arinos – MG	Sudeste
	16	UFVJC 40	Formoso – TO	Centro Oeste
	17	UFVJC 41	Jales – SP	Sudeste
	18	UFVJC 44	São Carlos – SP	Sudeste
	19	UFVJC 45	Barra dos Bugres – MT	Centro Oeste
	20	UFVJC 65	Desconhecida	Desconhecida
	21	UFVJC 69	Santa Bárbara do Tugurio – MG	Sudeste
	22	UFVJC 70	Arquimedes – RO	Norte
	23	UFVJC 85	Serranópolis – GO	Centro Oeste

No processo de extração de DNA foram utilizadas folhas jovens de cada genótipo seguindo o protocolo descrito por Doyle; Doyle (1990). A qualidade do DNA foi verificada em eletroforese em gel de agarose 1%. A quantificação e a pureza (relação das absorbâncias A260/A280) foram avaliadas utilizando o espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). Após a extração, todos os extratos foram diluídos para a concentração de 10 ng/μL e conservados a -20 °C.

Foram avaliados 23 iniciadores em três acessos de pinhão manso selecionados ao acaso, testando diferentes concentrações de MgCl<sub>2</sub> (1,5 mM, 2,0 mM e 2,5 mM) e diferentes temperaturas de anelamento (50 °C, 53 °C e 55 °C) nas reações de amplificação, possibilitando assim uma correta otimização. Destes, foram selecionados os iniciadores que apresentaram maior polimorfismo, maior número e melhor resolução de bandas.

## 2.2. Análises ISSR

As reações de amplificação foram realizadas com um volume final de 25 μL, utilizando PCR Buffer (1x), dNTPs (0,2 mM de cada), MgCl<sub>2</sub> (2mM), iniciador (0,8 μM), DNA genômico (30 ng/μL) e Taq DNA polimerase (1 U) (GoTaq Flexi DNA Polymerase, Promega®). O programa do termociclador (THERM-1000, Axygen®) constou de uma desnaturação inicial de 94 °C por 5 minutos e 40 ciclos de desnaturação, anelamento e extensão. Cada ciclo consistiu de 94 °C por 1 minuto, 50 °C, 53 °C ou 55 °C por 30 segundos (de acordo com os iniciadores utilizados) e 72 °C por 1 minuto. Houve ainda uma extensão final de 72 °C por 10 minutos.

Os produtos amplificados foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 2% em tampão 0,5X TBE (45 mM Tris-borato, pH 8,0, e 1 mM EDTA) com uma corrente de 90 volts, durante cerca de uma hora e meia. Os géis foram revelados com brometo de etídeo (10 ng/mL) e, posteriormente, visualizados e fotografados sob luz UV em fotodocumentador (Gel Logic 212 Pro, Carestream®).

## 2.3. Análise da divergência genética

Por meio da análise do padrão eletroforético dos produtos de PCR obtidos para cada iniciador, foi criada uma matriz binária, em que foi atribuído o valor 1 para a presença da banda e 0 para a ausência. Com os dados da matriz, procedeu-se à realização das análises estatísticas utilizando-se do software GENES (CRUZ, 2013).

Foi estimada a dissimilaridade genética, utilizando o complemento do índice de similaridade de Jaccard (1901), conforme mostra na expressão 1.

$$D_{ij} = \frac{a}{a+b+c} \quad (\text{Equação 1})$$

em que: *a* é presença de bandas nos indivíduos *i* e *j*, *b* é a presença de bandas no indivíduo *i* e ausência no indivíduo *j* e *c* é a ausência de bandas no indivíduo *i* e presença no indivíduo *j*.

A partir da matriz de dissimilaridade, foi construído o dendrograma utilizando a análise de agrupamento pelo método de Ligação Média entre Grupos (UPGMA) utilizando o software R versão 3.4.0 (R CORE TEAM, 2017). Também foi estimado o coeficiente de correlação cofenético (*r*) e o ponto de corte foi definido com base na metodologia de Mojena (1977), conforme mostra a expressão 2.

$$Pc = m + k Sd \quad (\text{Equação 2})$$

em que: *m* é a média, *k* é constante (1,25) e *Sd* é o desvio padrão.

Foi também realizado o agrupamento segundo o método de Tocher, permitindo o estabelecimento de grupos onde existe homogeneidade entre seus membros e heterogeneidade entre membros de grupos distintos.

Foi calculado o Conteúdo de Informação Polimórfica (PIC) para cada iniciador conforme a expressão 3 (ANDERSON et al., 1993):

$$PIC = 1 - \sum_j p_{ij}^2 \quad (\text{Equação 3})$$

em que: *P<sub>ij</sub>* corresponde à frequência do alelo *j* no marcador *i*.

Para verificar a existência de relação entre o agrupamento dos acessos e seu local de coleta, foi utilizado o Índice de Coincidência (IC) baseado no coeficiente de Jaccard (1901), representado na expressão 4:

$$IC = \frac{NC}{NC+NCC} \quad (\text{Equação 4})$$

em que: *NC* corresponde ao Número de coincidência entre grupos e região de coleta e *NCC* corresponde ao Número de não coincidência.

O ajuste do método constou da junção das discordâncias *a* e *b* da equação original (1) em uma só (*NCC*).

## 3. RESULTADOS

Na avaliação dos materiais vegetais quanto à variabilidade alélica, observou-se amplificação de 12 iniciadores dos 23 testados, sendo nove polimórficos (Tabela 2). Um total de 44 bandas foram geradas. O número de bandas por iniciador variou de uma (I-810) a 11 (UBC-825) e a taxa de polimorfismo variou de 0 % (I-812, I-841 e I-842) a 100 % (I-810, I-827, I-888, UBC-811, UBC-827, UBC-873 e UBC-880). Das 44 bandas amplificadas, 26 foram polimórficas, apresentando polimorfismo médio de 59,08 % e os ISSR que mais se destacaram na caracterização dos genótipos foram o UBC-825 devido ao número de bandas geradas (Figura 1) e o UBC-873 devido ao elevado Conteúdo de Informação Polimórfica (PIC). Os valores de PIC dos 12 iniciadores que geraram amplificação no estudo variaram de 0 a 0,728.

Os grupos formados utilizando os métodos UPGMA e Tocher estão apresentados na Tabela 3. O método de Tocher gerou três grupos, sendo os grupos I e II formados por acessos de diferentes origens. O grupo III é formado apenas pelo acesso 15, que foi coletado no sudeste do país e apresentou distância genética superior a encontrada entre todos os membros dos demais grupos.

O método UPGMA gerou seis grupos, tendo destaque os grupos III e VI, formados respectivamente pelos acessos 16 e 6, os quais apresentaram variabilidade suficiente para não se enquadrarem em nenhum dos demais grupos. Os acessos que foram agrupados individualmente pelas duas metodologias se mostram promissores para uso em cruzamentos, a fim de aumentar a variabilidade genética.

O Índice de Coincidência (IC), representado na Tabela 3, confirma a baixa relação existente entre o local de coleta dos acessos e sua distância genética. Na tabela observa-se que tanto o método de Tocher como o UPGMA apresentaram

índices de média magnitude (0,5217 e 0,6521), considerando que os valores do IC variam de 0 a 1.

O valor do coeficiente de correlação cofenética obtido ao comparar a matriz de dissimilaridade com a matriz gerada a partir do dendrograma pelo método UPGMA foi de 0,7195. De acordo com Rohlf (1970), valores menores que 0,7 indicam inadequação do método, assim, pode-se afirmar que o

dendrograma (Figura 2) foi representativo para os dados analisados, expressando bem os resultados do estudo.

A distância genética entre os acessos variou de 0,034 a 0,314. Os maiores índices de dissimilaridade foram observados entre os acessos 3 e 6, 7 e 23 e 15 e 18, enquanto os menores índices de dissimilaridade foram observados entre os acessos 14 e 22, 19 e 21 e 20 e 21 (Tabela 4).

Tabela 2. Iniciadores ISSR, sequência, temperatura de anelamento, número total de bandas, número de bandas polimórficas, porcentagem de polimorfismo e conteúdo de informação polimórfica (PIC) gerados pela amplificação dos DNAs dos acessos de *J. curcas* estudados.

Table 2. ISSR primers, sequence, annealing temperature, total number of bands, number of polymorphic bands, percentage of polymorphism and polymorphic information content (PIC) generated by DNA amplification of the *J. curcas* accessions under study.

Iniciador	Sequência 5'→3'	Temperatura de anelamento (°C)	Total de bandas	Nº de bandas polimórficas	% de polimorfismo	PIC
I-810	(GA) <sub>8</sub> T	50	1	1	100,0	0,086
I-812	(GA) <sub>8</sub> A	50	7	0	0,0	0
I-825	(AC) <sub>8</sub> AT	50	3	2	66,66	0,289
I-827	(AC) <sub>8</sub> G	53	3	3	100,0	0,086
I-841	(GA) <sub>8</sub> YC	50	2	0	0,0	0
I-842	(GA) <sub>8</sub> YG	50	5	0	0,0	0
I-888	BDB(CA) <sub>8</sub>	53	2	2	100,0	0,043
UBC-811	(GA) <sub>8</sub> C	50	2	2	100,0	0,086
UBC-825	(AC) <sub>8</sub> T	55	11	8	72,72	0,469
UBC-827	(CA) <sub>8</sub> G	50	2	2	100,0	0,195
UBC-873	(GACA) <sub>4</sub>	55	4	4	100,0	0,728
UBC-880	GGA(GAG) <sub>2</sub> AG(GA) <sub>2</sub>	55	2	2	100,0	0,673
TOTAL			44	26	59,08	0,210

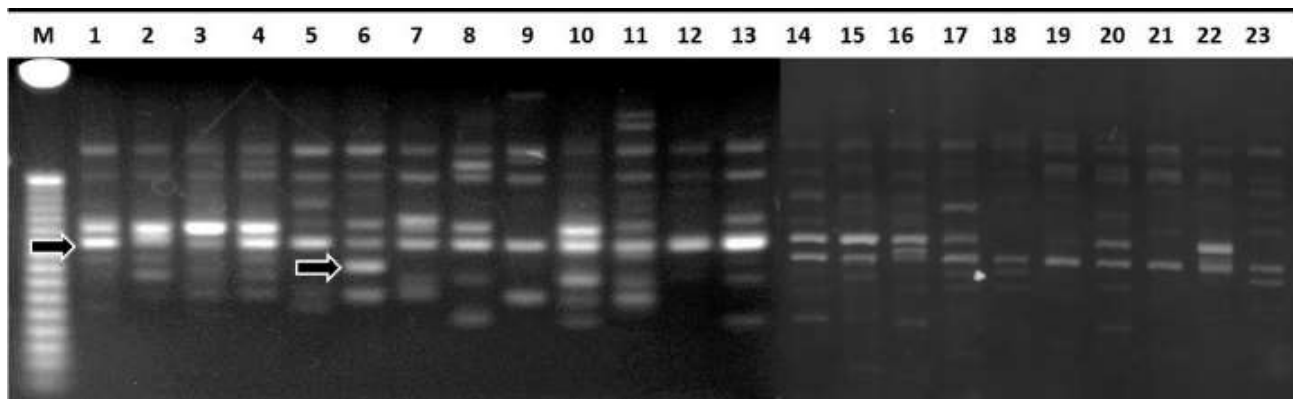
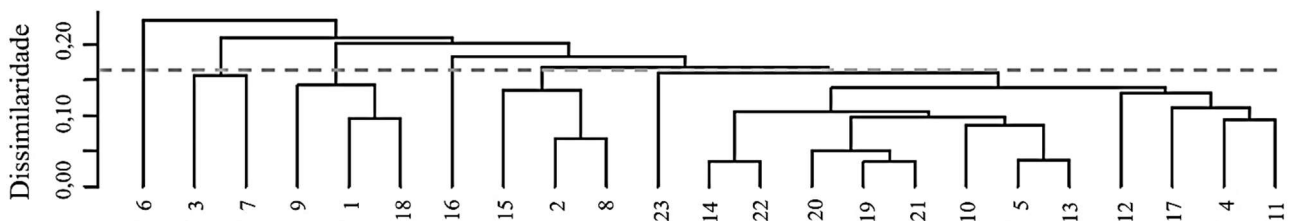


Figura 1. Perfil de amplificação do iniciador UBC-825 nos 23 acessos de pinhão manso. M: marcador de 50 bp (Promega®). As setas indicam bandas polimórficas.

Figure 1. Amplification profile of the UBC-825 primer in the 23 *Jatropha* accessions. M: 50 bp marker (Promega®). The arrows indicate polymorphic bands.



Coefficiente de correlação cofenética: 0,7195.  
Estresse: 21,7065.  
Distorção: 4,7171.

Figura 2. Dendrograma de dissimilaridade genética entre acessos estudados, obtido pelo método UPGMA. A linha tracejada indica o ponto de corte.

Figure 2. Dendrogram of genetic dissimilarity between the accessions under study, obtained by the UPGMA method. The dashed line indicates the cut-off point.

#### 4. DISCUSSÃO

A caracterização de leguminosas quanto ao seu potencial Em estudos realizados com acessos de pinhão manso,

utilizando iniciadores ISSR que apresentaram alta eficiência na distinção dos indivíduos, Grativol et al. (2010) observaram variação no PIC dos iniciadores de 0,19 a 0,31, e

Soonthornytara et al. (2015) encontraram variação de 0,0144 a 0,2050. Esses valores foram bastante inferiores aos observados nos iniciadores UBC-873 (0,728), UBC-880 (0,673) e UBC-825 (0,469) utilizados nesse estudo, destacando assim seu conteúdo de informação genética. A partir das informações geradas com esses iniciadores e utilizando dois métodos de agrupamento, observa-se que muitos acessos ainda foram alocados em um mesmo grupo (78,26% dos acessos por Tocher e 56,52 pelo método UPGMA), o que sugere uma origem comum dos acessos brasileiros (ROSADO et al., 2010).

Tabela 2. Agrupamento dos acessos pelo método UPGMA utilizando o coeficiente de Jaccard e o método de Tocher, e Índice de Coincidência entre o local de coleta dos acessos e a formação dos grupos.

Table 3. Grouping of accessions by UPGMA using the Jaccard coefficient and the Tocher method, and coincidence index between the site of accession collection and group formation.

Grupo	Método de Tocher	Método UPGMA
I	2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 17, 19, 20, 21, 22, 23	4, 5, 10, 11, 12, 13, 14, 17, 19, 20, 21, 22, 23
II	1, 3, 16, 18	2, 8, 15
III	15	16
IV		1, 9, 18
V		3, 7
VI		6
Índice de Coincidência	0,5217	0,6521

Tabela 4. Separação dos pares de acessos das coleções de germoplasma com maior e menor similaridade e suas distâncias genéticas.

Table 4. Separation of accession pairs from the germplasm collections with high and low similarity and their genetic distances.

	Acessos	Distância genética
Mais divergentes	3 e 6	0,314
	7 e 23	0,303
	15 e 18	0,303
	9 e 20	0,294
	1 e 15	0,281
	6 e 16	0,281
	9 e 15	0,281
	3 e 15	0,272
	6 e 17	0,272
	3 e 23	0,264
Mais similares	14 e 22	0,034
	19 e 21	0,034
	20 e 21	0,034
	5 e 13	0,037
	2 e 8	0,066
	8 e 10	0,066
	10 e 19	0,066
	19 e 20	0,066
	5 e 8	0,068
	5 e 17	0,068

Ao avaliar germoplasma de *Jatropha curcas* utilizando iniciadores ISSR, Basha et al. (2009) obtiveram 35,49 % de polimorfismo, enquanto Gomes (2013) obteve 95,76 % e Gupta et al. (2008) 76,54 %, o que mostra grandes variações nos resultados dos estudos. Essas variações podem ocorrer devido aos materiais vegetais e os iniciadores utilizados serem diferentes em cada pesquisa. No entanto, embora o estudo de

Basha et al. (2009) tenha utilizado genótipos com origem em 13 países, Gomes (2013) e Gupta et al. (2008) obtiveram maiores taxas de polimorfismo avaliando acessos coletados apenas no Brasil e na Índia, respectivamente. Tais resultados colaboram com a hipótese da existência de pequena variabilidade genética da espécie, mas também sugerem a necessidade de mais pesquisas com genótipos de *Jatropha curcas* provenientes desses dois países, onde a cultura tem mostrado boa adaptação e pode apresentar maior diversidade genética.

O agrupamento dos indivíduos fornece informações de grande importância, sendo fundamental a escolha de um método eficiente para a pesquisa. Verifica-se na Tabela 3 que o agrupamento dos acessos não acontece da mesma forma utilizando Tocher e a Ligação Média Entre Grupos (UPGMA) e isso reflete as metodologias distintas, embora ambas utilizem como base de separação dos genótipos as medidas de dissimilaridade. No entanto, observa-se que os resultados dos agrupamentos das duas metodologias ainda se sobrepuseram em 65,21%, o que indica a existência de um padrão de separação entre eles. A mesma equivalência foi observada por Reis et al. (2015).

O grupo I formado pelo método de Tocher e pelo método UPGMA representam 78,26% e 56,52% dos acessos estudados respectivamente, o que indica pequena variabilidade entre a maior parte dos genótipos, embora eles tenham sido coletados em diferentes regiões do país, com condições climáticas distintas.

Segundo Cruz et al. (2011), a escolha do método de agrupamento depende dos objetivos do estudo, já que métodos diferentes conduzem a resultados distintos. Dessa forma, a utilização dos dois métodos no trabalho é importante para um estudo mais completo da diversidade dos acessos. A Ligação Média Entre Grupos fornece o dendrograma que permite uma fácil visualização da distância genética entre os acessos avaliados (Figura 2). No entanto, na separação de grupos podem ocorrer variações de acordo com a metodologia utilizada para o cálculo do ponto de corte. Assim, o método de Tocher supre esse espaço através de uma maior segurança no agrupamento dos indivíduos. O método visa alcançar uma partição dos acessos que otimize os critérios avaliados, garantindo uma maior distância genética entre indivíduos de grupos diferentes do que a encontrada por membros do mesmo grupo (CRUZ et al., 2011).

Como o dendrograma foi gerado com base na dissimilaridade genética, quanto maior o valor da distância entre os pares de acesso, mais dissimilares geneticamente são esses acessos. O coeficiente de Jaccard foi utilizado por apresentar dendrogramas mais representativos e com menor distorção quando comparado com outros como o de Nei e Li e o de Coincidência Simples (SILVA, 2013).

Verifica-se que na maioria dos grupos formados pelos dois métodos estão presentes indivíduos coletados em diferentes regiões do país, indicando pouca variabilidade entre os genótipos avaliados. Reis et al. (2015) também verificaram essa baixa relação entre a diversidade genética e os locais de coleta ao avaliar caracteres morfo-agronômicos. Os valores de média magnitude dos Índices de Coincidência confirmam esses resultados, além de colaborar com a hipótese de baixa diversidade genética da espécie no país.

No entanto, embora observe-se na Tabela 4 que os pares de acessos mais similares são provenientes de regiões distintas do país, indicando pequena distância genética entre esses

genótipos embora sua coleta tenha sido feita em locais distantes, o par de acessos mais divergente provém da região Nordeste, onde a espécie mostra grande adaptação. Tal resultado sugere a necessidade de mais pesquisas com os acessos da região Nordeste e, em especial do estado do Ceará, que vêm sendo pouco estudados.

O dendrograma representado na Figura 2 apresentou coeficiente de correlação cofenética de 0,7195 e valores similares foram obtidos por outros pesquisadores ao avaliar a espécie. Silva (2013) obteve o valor de 0,77 ao utilizar marcadores ISSR na caracterização de 43 acessos de pinhão manso e Reis et al. (2015) avaliando 60 acessos da coleção da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) a partir de iniciadores SSR, obtiveram o valor de correlação cofenética de 0,74.

Segundo Kruskal (1964), os dados de estresse e distorção devem ser os menores possíveis para determinar boa precisão da projeção gráfica e tornar o agrupamento mais representativo. Como observado na Figura 2, esses valores estão no intervalo aceitável de ajustamento do método, pois possibilitaram que o coeficiente de correlação cofenética superasse os 70%.

Pode-se observar ainda na Figura 2 o ponto de corte gerado pela distância genética média, que permitiu a divisão do acesso em 6 grupos, já mostrados na Tabela 3. Reis et al. (2015), ao avaliarem acessos de pinhão manso coletados no Brasil verificaram que o agrupamento pelos métodos de Tocher e UPGMA também formaram números distintos de grupos e, assim como no presente trabalho, observou-se que para as duas metodologias, a maioria dos acessos (73,33% para Tocher e 83,33% para UPGMA) foi separada em um único grupo, embora tenham sido coletados em quatro diferentes regiões do Brasil, o que reforça a pequena variabilidade genética no país. Rosado et al. (2010) sugerem uma ascendência comum dos genótipos encontrados no Brasil e a intensa propagação vegetativa da espécie como possíveis causas para essa baixa diversidade, reportando a necessidade de introdução de novos e diversos acessos para garantir o sucesso dos programas de melhoramento da espécie.

Trebbi et al. (2015) também verificou alta uniformidade genética para a espécie ao avaliar acessos da América do Sul, África e Ásia. Ao trabalhar com genótipos de pinhão manso provenientes de diferentes regiões da Índia, Gohil; Pandya (2008) utilizaram o método de agrupamento de Tocher e, assim como no presente estudo, verificaram que não existiu relação entre a diversidade genética e a distribuição geográfica dos membros dos grupos. Montes et al. (2014) identificaram maior variabilidade em acessos provenientes da América Central, os quais podem ser estudados conjuntamente com outros acessos brasileiros para avaliar sua introdução nas coleções do Brasil para aumentar a variabilidade genética.

Outro fator que deve ser levado em consideração é a associação da divergência genética com o bom desempenho fenotípico dos genótipos na seleção dos melhores cruzamentos (LIMA et al., 2015). Dessa forma, é importante a avaliação agrônoma de todos os acessos estudados para garantir melhores resultados. Com os dados já obtidos para altura de plantas e produtividade por Silva (2013), podem ser sugeridos cruzamentos iniciais entre os genótipos que apresentem desempenho superior para esses caracteres (1 a 10) e que pertençam a grupos distintos, como entre os indivíduos 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 com os indivíduos 1 e 3.

A existência de variabilidade genética é uma condição básica para a obtenção de ganhos de seleção (SPINELLI et al., 2014) e sua determinação é crucial para a utilização dos acessos nos programas de melhoramento (MAVUSO et al., 2016). Assim, existe uma necessidade por acessos mais divergentes para a cultura, o que justifica a criação de coleções de germoplasma de pinhão manso, bem como sua caracterização com posterior cruzamento entre aqueles acessos de maior divergência genética.

Como a espécie ainda se encontra em processo de domesticação, as informações de diversidade genética são muito importantes para direcionar o processo de melhoramento. A aplicação da técnica multivariada de análise de agrupamento permite realizar a diferenciação de acessos e otimiza a utilização da coleção de germoplasma (REIS et al., 2015). Assim, no presente trabalho tal análise possibilitou a indicação de cruzamentos iniciais entre os acessos da coleção e também uma noção da diversidade genética da espécie no país.

## 5. CONCLUSÕES

Os acessos de pinhão manso estudados apresentam base genética estreita, mas os genótipos coletados na região Nordeste do Brasil apresentaram destaque como os mais divergentes, devendo ser mais estudados. Para uma melhor utilização dos acessos, há a necessidade de realização de análises agrônomicas que possam ser associadas aos conhecimentos de diversidade genética e auxiliar na escolha dos melhores cruzamentos.

## 6. AGRADECIMENTOS

À Petrobras (Projeto PetroBio Girassol, subprojeto IV: Avaliação de recursos genéticos de *Jatropha curcas*) pelo apoio financeiro.

## 7. REFERÊNCIAS

- ANDERSON, J. A.; CHURCHILL, G. A.; AUTRIQUE, J. E.; TANKSLEY, S. D.; SORRELLS, M. E. Optimizing parental selection for genetic linkage maps. **Genome**, Ottawa, v. 36, n. 1, p. 181–186. 1993. DOI: <https://dx.doi.org/10.1139/g93-024>
- BASHA, S. D.; FRANCIS, G.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K.; SUJATHA, M. A comparative study of biochemical traits and molecular markers for assessment of genetic relationships between *Jatropha curcas* L. germplasm from different countries. **Plant Science**, Davis, v. 176, n. 6, p. 812–823. 2009. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.plantsci.2009.03.008>
- BRASIL. **Biodiversidade Brasileira**. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/biodiversidade/biodiversidade-brasileira>>. Acesso em: 26 nov 2017.
- CARELS, N. Towards the domestication of *Jatropha*: the integration of sciences. In: Bahadur, B. et al. (Eds.). **Jatropha, Challenges for a New Energy Crop**. New York: Springer, 2013. p. 263–299.
- CRUZ, C. D. GENES - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 35, n. 3, p. 271–276. 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.4025/actasciagron.v35i3.21251>
- CRUZ, C. D. **Princípios de genética quantitativa**. 1. ed. Viçosa: Editora UFV, 2005. 394 p.

- CRUZ, C. D. **Programa Genes: Diversidade Genética**. 1. ed. Viçosa: Editora UFV, 2008. 278 p.
- CRUZ, C. D.; FERREIRA, F. M.; PESSONI, L. A. **Biometria aplicada ao estudo da diversidade genética**. Visconde do Rio Branco: Suprema, 2011. 620 p.
- DARCE, M. A. B. R. **Matérias-primas oleaginosas e biodiesel**. Disponível em: <<http://www.biodieselbr.com/i/biodiesel-biodiesel-brasil-potencial>> Acesso em: 20 out 2017.
- DE SOUZA, A. C.; RIBEIRO, R. P.; JACINTO, J. T. D.; CINTRA, A. D.; AMARAL, R. S.; DOS SANTOS, A. C.; MATOS, F. S. Consórcio de pinhão manso e feijoeiro: alternativa para agricultura familiar. **Agrarian**, Dourados, v. 6, n. 19, p. 36-42. 2013.
- DIAS, F. T. C.; BERTINI, C. H. C. de M.; DA SILVA, A. P. M.; CAVALCANTI, J. J. V. Variabilidade genética de feijão-caupi de porte ereto e ciclo precoce analisada por marcadores RAPD e ISSR. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 46, n. 3, p. 563-572. 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.5935/1806-6690.20150039>
- DOYLE, J. J. T.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, Atlanta, v. 12, p. 13-15. 1990.
- EVANGELISTA, A. W. P.; VIEIRA, M. A.; ALVES JÚNIOR, J.; BRASIL, E. P. F.; CASAROLI, D. Seedling production of *Jatropha curcas* in substrates fertilized with lithothamnium. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 32, n. 1, p. 132-139. 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.14393/BJ-v32n1a2016-26270>
- GOHIL, R. H.; PANDYA, J. B. Genetic diversity assessment in physic nut (*Jatropha curcas* L.). **Int J Plant Prod**, Gorgan, v. 2, n. 4, p. 321-326, 2008. DOI: <https://dx.doi.org/10.22069/ijpp.2012.623>
- GOMES, S. O. **Caracterização molecular em acessos de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) por meio de marcadores ISSR**. 2013. 57f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2013.
- GRATIVOL, C.; LIRA-MEDEIROS, C. da F.; HEMERLY, A. S.; FERREIRA, P. C. G. High efficiency and reliability of inter-simple sequence repeats (ISSR) markers for evaluation of genetic diversity in Brazilian cultivated *Jatropha curcas* L. accessions. **Molecular biology reports**, New York, v. 38, n. 7, p. 4245-4256. 2011. DOI: <https://dx.doi.org/10.1007/s11033-010-0547-7>
- GUPTA, S.; SRIVASTAVA, M.; MISHRA, G. P.; NAIK, P. K.; CHAUHAN, R. S.; TIWARI, S. K.; KUMAR, M.; SINGH, R. Analogy of ISSR and RAPD markers for comparative analysis of genetic diversity among different *Jatropha curcas* genotypes. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 7, n. 23, p. 4230-4243. 2008.
- JACCARD, P. Étude comparative de la distribution florale dans une portion des Alpes et des Jura. **Bulletin de la Société Vaudoise des Sciences Naturelles**, Lausanne. v. 37, n. 142, p. 547-579. 1901.
- JAIN, S.; SHARMA, M. N. Prospects of biodiesel from *Jatropha* in India: a review. **Renewable & Sustainable Energy Reviews**, Belfast, v. 14, n. 23, p. 763-771, 2010. DOI: <https://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2009.10.005>
- JUHÁSZ, A. C. P.; RESENDE, M. D. V. de; LAVIOLA, B. G.; COSTA, M. G. Melhoramento genético de *Jatropha curcas*: considerações e metodologias. In: RESENDE, J. C. F. de (Ed.). **Pinhão manso**. Nova Porteirinha: Suprema, 2013. p. 89-152.
- KRUSKAL, J. B. Multidimensional scaling by optimizing goodness of fit to a nometric hypothesis. **Psychometrika**, New York v. 29, n. 1, p. 1-27. 1964. DOI: <https://dx.doi.org/10.1007/BF02289565>
- LAVIOLA, B. G.; ANJOS, S. D. dos; JUHÁSZ, A. C. P.; ROCHA, R. B.; OLIVEIRA, R. J. P. de; ALBRECHT, J. C.; ALVES, A. A.; ROSADO, T. B. Desempenho agrônomo e ganho genético pela seleção de pinhão-manso em três regiões do Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 49, n. 5, p. 356-363, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2014000500005>
- LIMA, E. N.; ARAÚJO, M. E. B. de; BERTINI, C. H. C. de M.; MOURA, C. F. H.; HAWERROTH, M. C. Genetic diversity of clones of acerola assessed by ISSR molecular markers. **Comunicata Scientiae**, Bom Jesus. v. 6, n. 2, p. 174-180, 2015.
- MAVUSO, C.; WU, Y. P.; CHEN, F. C.; HUANG, B. H. LIN, S. J. Genetic diversity analysis of *Jatropha curcas* L. accessions cultivated in Taiwan using inter simple sequence repeats (ISSR) markers. **Agroforestry Systems**, Dordrecht, v. 90, n. 3, p. 417-431, 2016. DOI: <https://dx.doi.org/10.1007/s10457-015-9864-0>
- MOJENA, R. Hierarchical Grouping Methods and Stopping Rules: An Evaluation. **Comput**, v. 20, n. 4, p. 359-363. 1977. DOI: <https://dx.doi.org/10.1093/comjnl/20.4.359>
- MONTES, J. M.; TECHNOW, F.; MARTIN, M.; BECKER, K. Genetic Diversity in *Jatropha curcas* L. Assessed with SSR and SNP Markers. **Diversity**, Heidelberg, v. 6, n. 3, p. 551-566. 2014. DOI: <https://dx.doi.org/10.3390/d6030551>
- OVANDO-MEDINA, I.; ADRIANO-ANAYA, L.; VAZQUEZ-OVANDO, A.; RUIZ-GONZALEZ, S.; RINCÓN-RABANALES, M.; SALVADOR-FIGUEROA, M. Genetic diversity of *Jatropha curcas* in Southern Mexico. In: Bahadur, B. et al. (Eds.). **Jatropha, Challenges for a New Energy Crop**. New York: Springer, 2013. p. 219-250.
- R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. Vienna. **R Foundation for Statistical Computing**. 2017.
- RAPOSO, R. S.; SOUZA, I. G. B.; VELOSO, M. E. C.; KOBAYASHI, A. K.; LAVIOLA, B. G.; DINIZ, F. M. Development of novel simple sequence repeat markers from a genomic sequence survey database and their application for diversity assessment in *Jatropha curcas* germplasm from Guatemala. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto. v. 13, n. 3, p. 6099-6106, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.4238/2014.August.7.25>
- REIS, M. V. M.; DAMASCENO JÚNIOR, P. C.; CAMPOS, T. O.; DIEGUES, I. P. FEITAS, S. C. Variabilidade genética e associação entre caracteres em germoplasma de pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.). **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 46, n. 2, p. 412-420, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.5935/1806-6690.20150021>
- ROHLF, F. J. Adaptive hierarchical clustering schemes. **Systematic Zoology**, New Haven, v. 19, n. 1, p. 58-82. 1970. DOI: <https://dx.doi.org/10.1093/sysbio/19.1.58>
- ROSADO, T. B.; LAVIOLA, B. G.; FARIA, D. A.; PAPPAS, M. R.; BHERING, L. L.; QUIRINO, B.; GRATAPLAGLIA, D. Molecular Markers Reveal Limited Genetic Diversity in a Large Germplasm Collection of the Biofuel Crop *Jatropha curcas* L. in Brazil.

- Crop Science**, Madison. v. 50, n. 6, p. 2372-2382, 2010. DOI: <https://dx.doi.org/10.2135/cropsci2010.02.0112>
- SILVA, A. P. M. **Caracterização de acessos de *Jatropha curcas* da coleção de germoplasma da Universidade Federal do Ceará**. 2013. 66f. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitotecnia) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.
- SOONTHORNYATARA, S.; SRIPICHITT, P.; KAVEETA, R.; HONGTRAKUL, V. Assessment of genetic diversity of *Jatropha curcas* L. using AFLP and ISSR markers. **Chiang Mai Journal of Science**, Chiang Mai, v. 42, n. 3, p. 614-62, 2015.
- SPINELLI, V. M.; DIAS, L. A. S.; ROCHA, R. B.; RESENDE, M. D. V. Yield performance of half-sib families of physic nut (*Jatropha curcas* L.). **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Viçosa, v. 14, n. 1, p. 49-53, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1984-70332014000100008>
- TAPANES, N. C. O.; ARANDA, D. A. G.; CARNEIRO, J. W. M.; ANTUNES, O. A. C. Transesterification of *Jatropha curcas* oil glycerides: theoretical and experimental studies of biodiesel reaction. **Fuel**, Shaanxi, v. 87, n. 10-11, p. 2286-2295, 2008. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fuel.2007.12.006>
- TREBBI, D.; PAPA ZOGLOU, E. G.; SAADA OUI, E.; VISCHI, M., BALDINI, M.; STEVANATO, P.; CETTUL, E.; SANZONE, A. P.; GUALDI, L.; FABBRI, A. Assessment of genetic diversity in different accessions of *Jatropha curcas*. **Industrial Crops and Products**, St Martin d'Herès, v. 75, n. 2015, p. 35–39, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.06.051>