



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MONTES CLAROS**

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE GENÓTIPOS  
DE PINHÃO-MANSO POR MEIO DE RAPD E  
ISSR**

**BRUNO OLIVEIRA SOARES**

**2010**

**BRUNO OLIVEIRA SOARES**

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE GENÓTIPOS DE  
PINHÃO-MANSO POR MEIO DE RAPD E ISSR**

Dissertação apresentada à  
Universidade Estadual de Montes  
Claros, como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em  
Produção Vegetal no Semiárido, área  
de concentração em Produção  
Vegetal, para obtenção do título de  
“Magister Scientiae”.

**Orientador**  
**Profa. Dra. Márcia Regina Costa**

**JANAÚBA**  
**MINAS GERAIS - BRASIL**  
**2010**

S676d Soares, Bruno Oliveira.  
Diversidade genética de genótipos de pinhão-manso por meio de RAPD e ISSR [manuscrito] / Bruno Oliveira Soares. – 2010.

54 p.

Dissertação (mestrado)-Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal no Semiárido, Universidade Estadual de Montes Claros-Unimontes, 2010.  
Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. D.Sc. Márcia Regina Costa.

1. Diversidade genética. 2. *Jatropha curcas* L. 3. Melhoramento genético. 4. Pinhão-manso. I. Costa, Márcia Regina. II. Universidade Estadual de Montes Claros III Título

**BRUNO OLIVEIRA SOARES**

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE GENÓTIPOS DE PINHÃO-MANSO  
POR MEIO DE RAPD E ISSR**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Montes Claros, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal no Semiárido, área de concentração em Produção Vegetal, para obtenção do título de “Magister Scientiae”.

**APROVADA em 05 de outubro de 2010.**

Profa. Dra. Márcia Regina Costa  
UNIMONTES  
(Orientadora)

Profa. Dra. Silvia Nietsche  
UNIMONTES

Prof. Dr. Wagner A. Vendrame  
UNIVERSITY OF FLORIDA

Dra. Luciana Nogueira Londe  
EPAMIG / URENM

**JANAÚBA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2010**

## **DEDICATÓRIA**

Aos meus pais, Sebastião e Lígia, que me ensinaram o que é o amor e, mesmo à distância, me deram todo apoio necessário a conclusão deste trabalho.

Aos meus irmãos, Marcelo e Gustavo, com os quais aprendi que só o amor vale a pena.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus por esse momento de realização, por ter iluminado o meu caminho durante todos estes anos e me ensinar a sonhar;

À Professora Márcia Regina Costa, pela orientação e amizade. Por ter acreditado em mim e conduzido com sabedoria, paciência e dedicação a minha dissertação;

À Pesquisadora Ana Cristina Pinto Juhász pela coorientação, amizade. Por ter me ensinado o que é dedicação ao trabalho e empenho atrás de um sonho;

Aos professores da UNIMONTES, Campus Janaúba, indispensáveis nessa nossa caminhada;

A UNIMONTES e EPAMIG-URENM por disponibilizarem as condições necessárias para a realização do trabalho;

Aos amigos do Sociedade Espírita Allan Kardec que foram a minha família quando mais precisei em Janaúba;

A todos, a minha mais sincera gratidão!

## RESUMO

SOARES, Bruno Oliveira. **Diversidade genética de genótipos de pinhão-manso por meio de RAPD e ISSR**. 2010. 54 p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal no Semiárido) – Universidade Estadual de Montes Claros, Janaúba, MG.<sup>1</sup>

O pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) é uma planta oleaginosa que possui características agrícolas como alta produtividade e alto conteúdo de óleo nas sementes, tornando-o um excelente candidato na produção de biocombustível. Sua domesticação iniciou-se apenas nos últimos 30 anos, e pouco se conhece sobre sua diversidade genética. Este estudo teve como objetivo analisar a diversidade genética entre 46 genótipos de pinhão-manso por meio de marcadores RAPD e ISSR. Os genótipos avaliados pertencem à coleção da EPAMIG/URNM, composta por acessos coletados no Norte de Minas Gerais, Vale do Jequitinhonha, além introduções da China e Cabo Verde. Realizou-se a extração de DNA pelo método proposto por Basha e Sujatha (2007). Para as reações de amplificação, foram utilizados 33 *primers* RAPD e 13 *primers* ISSR. As distâncias genéticas foram estimadas com base no coeficiente de similaridade de DICE, e de acordo com estas, elaborou-se um dendrograma a partir da análise de agrupamento pelo Método da Ligação Média entre Grupo (UPGMA) da matriz conjunta dos dados. Para a análise dos dados obtidos utilizou-se o programa estatístico Genes. Foi possível observar a formação de apenas dois agrupamentos, sendo que um possuía apenas três indivíduos, e o outro 95,6% dos genótipos analisados. A distância genética variou de 1,26 a 76,15%, com distância genética média de 20,90%. Os genótipos mais divergentes foram os 86, 71 e 83. A baixa diversidade genética encontrada indica a necessidade de se iniciar investigações, a fim de alargar a base genética e aumentar a variabilidade desta espécie. Os genótipos 86, 71 e 83, por possuírem alto valor em distância genética, podem ser utilizados como genitores de um híbrido no programa de melhoramento.

**Palavras-chave:** *Jatropha curcas* L., diversidade genética, melhoramento genético.

---

<sup>1</sup> **Comitê de Orientação:** Prof.<sup>ª</sup> Dra. Márcia Regina Costa – Departamento de Ciências Agrárias/UNIMONTES (Orientadora); Pesquisadora Dra. Ana Cristina Pinto Juhász – EPAMIG-URETP (Coorientadora).

## ABSTRACT

SOARES, Bruno Oliveira. **Genetic diversity of physic nut genotypes by means of RAPD and ISSR**. 2010. 54 p. Dissertation (Master's Degree in Plant Production in the Semi-Arid) – Universidade Estadual de Montes Claros, Janaúba, MG.<sup>1</sup>

Physic nut (*Jatropha curcas* L.) is an oleaginous plant that possesses agricultural characteristics such as high productivity and high oil content in seeds, becoming an excellent candidate for biofuel production. Its domestication began just in the last 30 years, and little is known about its genetic diversity. This study aimed to analyze the genetic diversity among 46 genotypes of physic nut by means of RAPD and ISSR markers. The evaluated genotypes belong to EPAMIG / URM's collection, composed by accessions collected in the Norte de Minas Gerais, Vale do Jequitinhonha, besides introductions from China and Cabo Verde. The DNA was extracted through method proposed by Basha and Sujatha (2007). For the amplification reactions were used 33 RAPD primers and 13 ISSR ones. The genetic distances were calculated based on DICE similarity coefficient, and according to them was drawn up a dendrogram from the cluster analysis by Unweighted Pair Groups Method with Arithmetic Mean (UPGMA) of the whole data matrix. For the data analysis it was used the statistical program Genes. It was possible to observe the formation of only two clusters, from which one had only tree individuals, and one 95,6% of the genotypes analyzed. The genetic distance ranged from 1,26 to 76,15%, with average genetic distance of 20,90%. The most divergent genotypes were 86, 71 and 83. The low genetic diversity found indicates the need to initiate investigations in order to broaden the genetic base and to increase the variability of this species. The genotypes 86, 71 and 83, for possess high value in genetic distance, can be used as parents in a breeding program.

**Keywords:** *Jatropha curcas* L., genetic diversity, breeding

---

<sup>1</sup> **Guidance committee:** Prof<sup>a</sup>. DSc. Márcia Regina Costa – Department of Agrarian Sciences/UNIMONTES (Adviser); Researcher DSc. Ana Cristina Pinto Juhász – EPAMIG-URETP (Co-adviser).

## Sumário

<b>1. Introdução e Justificativa.....</b>	<b>1</b>
<b>2. Objetivos.....</b>	<b>5</b>
<b>3. Revisão Bibliográfica.....</b>	<b>6</b>
<b>3.1. Importância.....</b>	<b>6</b>
<b>3.2. Origem e distribuição do pinhão-manso (<i>Jatropha curcas</i> L.).....</b>	<b>7</b>
<b>3.3. Fenologia do pinhão-manso.....</b>	<b>8</b>
<b>3.4. Recursos e diversidade genética.....</b>	<b>10</b>
<b>3.5. Uso de marcadores moleculares em estudos de diversidade genética ...</b>	<b>11</b>
<b>4. Material e Métodos.....</b>	<b>14</b>
<b>4.1. Coleta do Material Genético.....</b>	<b>14</b>
<b>4.2. Extração do DNA.....</b>	<b>16</b>
<b>4.3. Análise de RAPD.....</b>	<b>18</b>
<b>4.4. Análise de ISSR.....</b>	<b>19</b>
<b>5. Resultados e Discussão.....</b>	<b>21</b>
<b>5.1. Extração de DNA.....</b>	<b>21</b>
<b>5.2. Análise da diversidade genética.....</b>	<b>21</b>
<b>6. Conclusão.....</b>	<b>30</b>
<b>7. Referências bibliográficas.....</b>	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
<b>8. Anexo A.....</b>	<b>38</b>



## **1. Introdução e Justificativa**

A comprovação do efeito antropogênico no acúmulo de gases responsáveis pelo efeito estufa (CO<sub>2</sub> e metano, principalmente) foi descrita no relatório do Painel Intergovernamental de Mudanças Climáticas - IPCC (ROCHA, 2006). A substituição dos combustíveis fósseis por renováveis foi uma das propostas apresentadas para reduzir emissões desses gases até 2012, conforme firmado no Protocolo de Kyoto.

Dessa forma, a demanda mundial por combustíveis renováveis tem se expandido rapidamente. Há diversas matrizes energéticas renováveis para a produção de energia em substituição aos derivados do petróleo, como os biocombustíveis, oriundos de produtos agrícolas como cana-de-açúcar, plantas oleaginosas, biomassa florestal e matéria orgânica (GOLDEMBERG, 2007). Na substituição dos combustíveis fósseis por renováveis, o Brasil tem se destacado no cenário mundial por apresentar reais condições para se tornar um dos maiores produtores de biocombustíveis do mundo. As pesquisas brasileiras de substituição em larga escala dos derivados do petróleo tiveram início na década de 70 com o desenvolvimento do Programa Nacional do Alcool - ProAlcool (GOLDEMBERG, 2007). Na atualidade, o governo brasileiro tem incentivado e apoiado o desenvolvimento de tecnologias para melhorar o rendimento e a qualidade dos óleos vegetais por meio do Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel (RODRIGUES, 2005).

Teoricamente, qualquer oleaginosa pode ser utilizada para produção de biodiesel, porém devem-se considerar as vantagens de cada espécie, tais como a produtividade de óleo, robustez, custo de produção, custo de logística, capacidade de armazenagem, valor dos subprodutos, capacidade de geração de renda, nível tecnológico da cultura, adaptabilidade da cultura às condições regionais e sustentabilidade da cultura escolhida (CAMPOS, 2006). Destacam-se, neste cenário, as culturas oleaginosas da soja, mamona, palma (dendê),

girassol, amendoim, caroço de algodão, milho, canola (colza), nabo-forageiro, macaúba, babaçu, pequi, buriti, pinhão-manso, entre outras (MIRAGAYA, 2005).

Dentre as culturas oleaginosas, o pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) tem se destacado por possuir características agrícolas interessantes como alta produtividade, alto conteúdo de óleo nas sementes, e por não ser utilizado na alimentação humana (SATURNINO *et al.*, 2005). Apesar das características citadas, sua domesticação teve início somente nos últimos 30 anos quando passou a ser pesquisado agronomicamente por apresentar resistência ao *stress* hídrico, recuperação de áreas degradadas e por sua aplicação medicinal (SATURNINO *et al.*, 2005).

Em virtude do pouco tempo de domesticação da espécie, ainda não foram desenvolvidas cultivares de pinhão-manso e, nos últimos 30 anos foram desenvolvidos apenas estudos básicos sobre biologia floral, diversidade genética e comportamento agrícola em materiais não homogêneos (HENNING, 2006, DIVAKARA., *et al.* 2010, JUHÁSZ, *et al.*, 2009, JUHÁSZ, *et al.*, 2010) Uma das maneiras de conhecer uma espécie é estudando a sua diversidade genética através de características fenotípicas e moleculares. Estas informações são muito importantes para a condução de programas de conservação e melhoramento genético desta espécie. O primeiro passo para a realização desses programas é organizar estes recursos genéticos em Bancos de Germoplasma através da introdução de materiais de diferentes origens que, após caracterização e avaliação, fornecerão uma base sólida para o desenvolvimento de variedades-elite (DIVAKARA., *et al.*, 2010).

Para o pinhão-manso, trabalhos sobre coleta, caracterização e avaliação de germoplasma para o crescimento, a morfologia, as características da semente e características de rendimento estão apenas iniciando, e o fato de o pinhão-manso ter se adaptado a uma gama de condições edáficas e ecológicas

sugere que existe uma variabilidade genética considerável a ser explorada (RAO, *et al.*, 2008).

Juhász, *et al.*, 2010 estimaram parâmetros genéticos na fase vegetativa em cinco populações de pinhão-manso na região norte de Minas Gerais ao estudarem as características fenotípicas: diâmetro de caule, altura de planta, projeção da copa e número de ramos. Eles concluíram que os caracteres avaliados apresentam herança complexa típica de caracteres quantitativos e que houve variabilidade genética para quatro das cinco populações avaliadas.

Basha e Sujatha (2007), via marcadores RAPD e microssatélites, caracterizaram 48 genótipos de pinhão-manso provenientes de diferentes regiões da Índia, e um proveniente do México, constatando que 83% dos acessos indianos caracterizados agruparam-se em dois grandes grupos, enquanto o acesso do México formou um grupo unitário, observando o que caracteriza variabilidade genética para a cultura.

O desenvolvimento e a aplicação de tecnologias baseadas em marcadores moleculares fornecem ferramentas únicas, capazes de revelar o polimorfismo em nível de sequências de DNA, suficientes para discriminar a variação genética existente entre os indivíduos e dentro de populações (SOUZA, 2002). Dentre os marcadores existentes, os RAPD (*Random Amplified Polymorphism DNA*) e os ISSR (*Inter-Simple Sequence Repeat*) têm sido muito utilizados para caracterização e avaliação da variabilidade genética em diversas culturas (GRATTAPAGLIA, 2001). Segundo o mesmo autor, esses marcadores são considerados ideais para a compreensão de padrões de fluxo gênico e parentesco, além de permitir uma amostragem extensiva do genoma de interesse com relação a DNA, sem influência do ambiente, e gerando uma grande quantidade de caracteres adicionais, bem como dos fenotípicos, que fornecem um quadro mais completo para o agrupamento de genótipos e o planejamento de cruzamentos.

Normalmente, o melhorista precisa manipular o germoplasma disponível, a fim de usar a diversidade genética existente nas coleções, buscando genótipos que, por meio de metodologias adequadas, possam gerar materiais genéticos superiores. Dessa forma, a Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais – Unidade Regional Norte de Minas (EPAMIG-UREN) disponibilizou o Banco de Germoplasma Ativo (BGA) de *Jathopha curcas* existente nessa unidade e composto, basicamente, de genótipos oriundos das regiões Norte e Vale do Jequitinhonha do Estado de Minas Gerais além de introduções da China e Cabo Verde.

O conhecimento da variabilidade genética existente entre os diferentes genótipos disponíveis neste BGA será de suma importância para iniciar programas de melhoramento, determinando as estratégias (metodologias) mais adequadas para obtenção de cultivares superiores.

## **2. Objetivos**

Analisar a diversidade genética entre 46 genótipos de pinhão-manso provenientes do Banco de Germoplasma Ativo da EPAMIG-URENM, por meio de marcadores RAPD e ISSR.

### **3. Revisão Bibliográfica**

#### **3.1. Importância**

O biodiesel surgiu como alternativa promissora aos combustíveis fósseis em várias partes do mundo, incluindo o Brasil (BIODIESEL, 2007). A União Européia produz biodiesel em escala industrial desde 1992. Na Alemanha, existe uma frota significativa de veículos leves, coletivos e de carga, que utiliza biodiesel derivado de plantações específicas para fins energéticos e distribuído por mais de 1.000 postos de abastecimento (RAMOS *et al.*, 2003). No Brasil, o Governo Federal lançou, no ano de 2002, o Programa Brasileiro de Biocombustíveis, com o objetivo de viabilizar a utilização do biodiesel, pois este poderia contribuir para diminuir a dependência dos combustíveis fósseis (MIRAGAYA, 2005).

A grande diversidade de ecossistemas no Brasil permite a utilização de muitas oleaginosas para a produção de biocombustíveis líquidos, apresentando reais condições para tornar o país um dos maiores produtores de biodiesel do mundo. Existem cultivos de plantas oleaginosas com grande potencial de uso energético como o dendê (palma), a cultura com maior produção por hectare, porém apresenta limitações para sua disseminação no território brasileiro e no processamento dos frutos (TEIXEIRA, 2005). A mamona apresenta boa produtividade, mas possui restrições quanto a características de seu óleo e ao alto preço de mercado; já a soja apresenta um rendimento de óleo por hectare inferior, quando comparada com outras espécies (GONÇALVES *et al.*, 2005). O pinhão-mansão tem se destacado pelas excelentes perspectivas de sua utilização para produção de biodiesel. Essa planta está sendo explorada no Sudeste Asiático (Índia, China, Tailândia, Camboja, dentre outros), na África e na América Central e Caribe (Nicarágua, Belize e Cuba) (TEIXEIRA, 2005). Contudo, o conhecimento técnico sobre a

cultura é extremamente limitado, visto que o pinhão-mansão encontra-se em processo de domesticação e somente nos últimos 30 anos começou a ser pesquisado agronomicamente, como alternativa aos derivados do petróleo.

### **3.2. Origem e distribuição do pinhão-mansão (*Jatropha curcas* L.)**

O pinhão-mansão (*Jatropha curcas* L.) pertence à família Euphorbiaceae que está representada no Brasil por, aproximadamente, 72 gêneros e 1.100 espécies de diferentes hábitos e *habitats* (WEBSTER, 1994). O gênero *Jatropha* possui cerca de 175 espécies distribuídas pela América Tropical, Ásia e África. O pinhão-mansão possui uma distribuição natural desde o México até o Brasil, incluindo as ilhas do Caribe (SATURNINO *et al.*, 2005).

Tem como o centro de origem o México e a América Central, porém apresenta ampla distribuição em diversas partes do mundo, e no continente americano sua distribuição vai do México até o Brasil (HEIFFIG e CÂMARA, 2006). É adaptável a condições climáticas muito variáveis e seu cultivo tem se estendido a diferentes tipos de solo. No Brasil, a espécie adapta-se desde a região Nordeste até os Estados de São Paulo e Paraná. Nessas regiões, sul e sudeste, pode-se encontrá-lo em estado nativo, sendo que a maior incidência da planta ocorre nos plantios isolados para uso como cerca viva ou cultivados, em menor número, como fonte de óleo para uso medicinal (SATURNINO *et al.*, 2005).

No mundo se encontra amplamente difundido em uma faixa de latitude limitada ao norte do equador em 30 ° e ao sul a 35 °. Nessa faixa de terra encontra-se, naturalmente, esta espécie em países que, como Índia, China e Cabo Verde, que realizam estudos regulares a respeito dessa cultura (JONGSCHAAP *et al.*, 2008)

### 3.3. Fenologia do pinhão-mansô

O pinhão-mansô é uma árvore suculenta que atinge de 3 a 5 metros, com um diâmetro de tronco de 20 centímetros, com caule liso, macio, esverdeado cinzento-castanho, e floema pouco resistente, brando, tendo sua medula desenvolvida. As folhas são decíduas, alternadas, filotaxia em espiral, cordadas na base e possuem de três a cinco lóbulos. As folhas novas apresentam coloração vermelho-vinho, cobertas com lanugem branca e à medida que se expandem, tornam-se verdes. Durante a estação fria e seca, as folhas caem. As plantas permanecem em repouso até o começo da primavera ou da época das chuvas. A brotação e o surgimento das inflorescências apontam o fim do repouso vegetativo (PEIXOTO, 1973).

A espécie é monoica, cuja inflorescência é do tipo cimeira definida, onde as flores são amarelo-esverdeadas, unissexuais e produzidas na mesma inflorescência. As flores femininas apresentam-se com pedúnculo longo, não articulado, com três células elípticas, ovário com três carpelos, cada um com um lóculo que produz um óvulo com três estigmas bifurcados e separados. As flores masculinas possuem dez estames, cinco unidos na base e cinco na coluna, sendo mais numerosas e situadas nas pontas das ramificações (SATURNINO *et al.*, 2005). Na inflorescência do pinhão-mansô, pode-se observar que as flores femininas variam de cinco a vinte e que essas abrem em dias diferentes (RAJU e EZRADANAM, 2002)

A flor feminina da primeira bifurcação do cacho abre antes, depois vão se abrindo as situadas acima da primeira, o que força a polinização cruzada ou xenogâmica (SATURNINO *et al.*, 2005). Raju e Ezradanam (2002) estudaram a frutificação do pinhão-mansô e relataram que em uma inflorescência a proporção de flores femininas é de 1-5 flores para 25-93

masculinas e que a abertura ocorre pela manhã e a deiscência da antera ocorre uma hora após a abertura da flor. Os estigmas tornam-se receptíveis depois que a flor se abre e permanecem assim por três dias. As flores não polinizadas caem no quarto dia, enquanto as polinizadas permanecem, onde as sépalas e pétalas aumentam gradualmente para proteger o fruto até que alcance seu máximo desenvolvimento (SATURNINO *et al.*, 2005).

Quanto aos polinizadores, Raju e Ezradanam (2002) observaram que na base das flores tanto femininas quanto masculinas existem glândulas elípticas produtoras de néctar favorecendo, assim, a polinização entomófila. Os principais polinizadores são abelhas (*Apis mellifera*), moscas, tripes e formigas o que promove uma taxa de geitonogamia de 77% e xenogamia de 96% (RAJU e EZRADANAM, 2002; SATURNINO *et al.*, 2005). Juhasz *et al.* (2009) encontraram uma taxa de 88% de xenogamia nas condições do Norte de Minas Gerais.

Suas características de polinização cruzada definem-na como uma planta alógama, e apresenta indivíduos  $2n = 22$  cromossomos e possui um genoma relativamente pequeno  $C = 416$  Mb (CARVALHO *et al.*, 2008).

Segundo Aker (2007), o desenvolvimento do fruto é do tipo das euforbiáceas como a mandioca, mamona e seringueira, nas quais os frutos fecundados continuam a crescer depois da maturação dos primeiros frutos de um cacho. Os frutos são do tipo cápsula trilocular, carnudos e amarelados quando maduros, contendo três sementes (SATURNINO *et al.*, 2005). O fruto compõe-se de 27,8% de casca, 26,2% de epicarpo e 46% de albúmen e é nesta região que se encontra o maior teor de óleo, podendo chegar a 60,8% (BRASIL, 1985). O pinhão-manso é uma planta de ciclo perene, que pode produzir de 1 a 6 toneladas de óleo por hectare dependendo da idade da planta, começando a produzir aos 10 meses e atingindo a sua plenitude de produção por volta do quarto ano, podendo chegar aos 50 anos produzindo (PEIXOTO, 1973).

O pinhão-manso apresenta uma baixa exigência hídrica e nutricional; contudo, dependendo das condições de solo e regimes pluviométricos, foram observadas produtividades agrícolas que variaram de 0,5 a 12 t/ha ano (BASHA *et al.*, 2009). Também possui precocidade na produção e baixo custo final do óleo (TEIXEIRA, 2005), possibilitando ainda a recuperação de áreas degradadas como o projeto de combate a desertificação em Mali, segundo Henning (2006). Além disso, seus componentes químicos (toxalbumina jatrofina [curcina], ésteres de forbol e flavonoides) das sementes são utilizados no Sudeste Asiático para fins medicinais como o tratamento do câncer, da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) e de efeitos anti-inflamatórios (LIN *et al.*, 2003; LUO *et al.*, 2006; STAUBMANN *et al.*, 1999).

#### **3.4. Recursos e diversidade genética**

O estudo da diversidade visa a elucidar relações genéticas, quantificar ou prever o nível de variabilidade total existente e a sua distribuição entre e/ou dentro de unidades taxonômicas, quer elas sejam indivíduos, acessos de banco de germoplasma, linhagens, cultivares, populações de sistemas controlados de acasalamento ou naturais e espécies. Este conhecimento tem proporcionado importantes contribuições ao melhoramento genético, ao gerenciamento de bancos de germoplasma, à conservação de recursos genéticos e ao entendimento dos processos evolutivos das espécies (PERSSONI, 2007).

A quantificação da diversidade genética auxilia no planejamento de estratégias mais eficazes que venham a maximizar os ganhos genéticos no melhoramento. Dentre as possibilidades de estudos da diversidade, destacam-se: determinação das inter-relações genéticas entre linhagens, cultivares e

populações; identificação de combinações parentais adequadas à obtenção de híbridos altamente heteróticos e que possibilitem maior segregação em recombinações, com o aparecimento de transgressivos; introgressão de genes favoráveis provenientes dos acessos de bancos de germoplasma, componentes da base genética da espécie-alvo; identificação de variedades derivadas no processo de proteção de cultivares (MOHAMMADI e PRASANNA, 2003; REIF *et al.*, 2005).

Nos bancos de germoplasma, a análise da diversidade pode ajudar a classificar corretamente um acesso, identificar duplicatas e subgrupos de coleções-núcleo e auxiliar na quantificação do nível de variabilidade presente em um *pool* gênico, bem como seu fluxo através do tempo (REIF *et al.*, 2005).

### **3.5. Uso de marcadores moleculares em estudos de diversidade genética**

Atualmente, existem muitos métodos disponíveis para o estudo da diversidade genética, seja em avaliações de acessos de bancos de germoplasma, cultivares melhoradas ou populações. Esses métodos podem ser aplicados na análise de dados de *pedigree*, dados morfológicos, dados de performance agrônômica, dados bioquímicos e dados moleculares baseados na análise de DNA (FEDERIZZI, 1998).

A utilização de marcadores moleculares tornou possível a identificação e caracterização de germoplasma, a construção de mapas genéticos e a estimativa da distância genética entre indivíduos e/ou populações de várias espécies vegetais (BOREM e CAIXETA, 2006). Tais tecnologias podem contribuir para uma aceleração de ganhos genéticos em plantas de interesse, especialmente em culturas cujas informações ainda limitadas, como é o caso da maioria das espécies tropicais arbóreas (FERREIRA e GRATTAPALIA, 1998; PICOLI *et al.*, 2001). De modo semelhante, as informações de diversidade e

distância genética têm sido avaliadas para a identificação das melhores combinações híbridas e na organização de bancos de germoplasma; indicando redundâncias e deficiências das coleções, além de gerar dados sobre a eficiência do processo de coleta, manutenção e ampliação de um banco de germoplasma (BARBOSA-NETO e BERED, 1998).

O desenvolvimento de marcadores bioquímicos e moleculares proporcionou um salto qualitativo e quantitativo em estudos da estrutura populacional e do sistema produtivo de diversas espécies. Vários parâmetros populacionais, como grau de endogamia e sistema reprodutivo predominante, dentre outros, podem ser obtidos e são de grande importância na determinação de estratégias de conservação da variabilidade genética na natureza, bem como para sua melhor utilização em programas de melhoramento genético das espécies (REIF *et al.*, 2005).

Barbosa-Neto e Bered (1998) argumentaram que não há sérias restrições quanto aos marcadores moleculares preferenciais para utilização em estudos de diversidade genética. De modo geral, os marcadores devem ser confiáveis em termos de repetibilidade, ter baixo custo e serem fáceis e rápidos de analisar. Além disso, permitirem uma amostragem extensiva dos genomas de interesse ao nível de DNA sem a influência do ambiente. Nesse sentido, os marcadores baseados em técnicas de PCR (reação em cadeia da polimerase) são mais atrativos, principalmente aqueles que apresentam grande polimorfismo.

Dentre os marcadores de DNA baseados em PCR, tem-se o RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) e o ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*). Ambos apresentam a característica de dominância, ou seja, estes tipos de marcadores não permitem distinguir indivíduos homocigotos de heterocigotos. A técnica RAPD apresenta as vantagens de: simplicidade, facilidade na obtenção de dados, custo relativamente reduzido, em relação a outras técnicas moleculares, e a aplicabilidade imediata a qualquer tipo de

organismo, sem a necessidade de conhecimento prévio do seu genoma, porém pode apresentar baixa reprodutibilidade. A técnica de ISSR também apresenta todas as vantagens citadas para a técnica de RAPD, mais um elevado grau de reprodutibilidade, resultante do comprimento dos *primers* empregados (16 a 25 pb) e de condições de anelamento mais estritas (com temperaturas de anelamento entre 45 °C e 60 °C) (BORÉM e CAIXETA, 2006).

Poucos trabalhos para conhecer a diversidade genética do pinhão-mansão foram realizados no Brasil. Gois *et al.* (2006) avaliaram oito acessos de Minas Gerais, quatro de Goiás, um do Espírito Santo e um de Sergipe através da técnica de isoenzimas, encontrando acessos altamente similares e outros bem divergentes. Divakara (2010) em uma revisão sobre os aspectos biológicos e o melhoramento de *Jatropha curcas* reúne em uma tabela nove referências sobre trabalhos que utilizaram marcadores moleculares para caracterizar acessos em pinhão-mansão, dentre estes, Basha e Sujatha (2007) avaliaram 42 acessos de *J. curcas* L. de diferentes regiões da Índia. Esses autores usaram *primers* RAPD e ISSR para determinar a diversidade genética desses acessos e concluíram a necessidade imediata de aumentar a base genética do pinhão-mansão naquele país, devido à baixa diversidade genética encontrada entre os acessos. Ainda registraram algumas marcas específicas para determinadas regiões, conseguindo diferenciar especificamente materiais com origens diversas.

O baixo número de trabalhos publicados reforça a necessidade de um estudo mais apurado sobre a diversidade genética de pinhão-mansão no Brasil e, principalmente, em regiões promissoras na produção do mesmo, como as regiões Norte e Vale do Jequitinhonha de Minas Gerais.

## 4. Material e Métodos

### 4.1. Coleta do Material Genético

Foram coletadas folhas jovens de 46 genótipos de pinhão-manso que se encontram no Banco de Germoplasma de Pinhão-manso da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais - Unidade Regional do Norte de Minas (EPAMIG/URENM). Durante o processo de coleta, a nervura central das folhas foi retirada e descartada, sendo o material envolvido em papel alumínio previamente identificado, acondicionado em recipiente resfriado e conduzido ao Laboratório de Biotecnologia da UNIMONTES.

Foram utilizados genótipos da região Norte de Minas, Vale do Jequitinhonha, Bahia, China e Cabo Verde. A procedência dos genótipos encontra-se descrita na Tabela 1.

TABELA 1  
Identificação e origem de genótipos de pinhão-manso (*J. curcas* L.) utilizados na análise genômica.

Nº	Identificação	Localidade	Cidade	Estado / País
1	21	Paciência	Porteirinha	Minas Gerais – BR
2	87	Sada Pivot 3020	Jaíba	Minas Gerais – BR
3	52		Januária	Minas Gerais – BR
4	58		Carbonita	Minas Gerais – BR
5	30	Banavit	Nova Porteirinha	Minas Gerais – BR
6	16	Paciência	Porteirinha	Minas Gerais – BR
7	44		Diamantina	Minas Gerais – BR
				... continua...

Tabela 1 Cont.

8	41		Malacacheta	Minas Gerais – BR
9	76	Biojan-MG	Janaúba	Minas Gerais – BR
10	17	Paciência	Porteirinha	Minas Gerais – BR
11	74	Biojan-MG	Janaúba	Minas Gerais – BR
12	78	Biojan-MG	Janaúba	Minas Gerais – BR
13	59		Carbonita	Minas Gerais – BR
14	83	Sada pivot 4313	Jaíba	Minas Gerais – BR
15	7	Matinha	Nova Porteirinha	Minas Gerais – BR
16	71	Sada pivot 4013	Jaíba	Minas Gerais – BR
17	45	São Lucas	Janaúba	Minas Gerais – BR
18	55		Carbonita	Minas Gerais – BR
19	25	Barbosa	Janaúba	Minas Gerais – BR
20	12	Paciência	Porteirinha	Minas Gerais – BR
21	65	Arinos	Arinos	Minas Gerais – BR
22	32	Banavit	Nova Porteirinha	Minas Gerais – BR
23	27	Sub-estação	Janaúba	Minas Gerais – BR
24	43		Araçuaí	Minas Gerais – BR
25	36	Banavit	Nova Porteirinha	Minas Gerais – BR
26	79	Biojan-MG	Janaúba	Minas Gerais – BR
27	86	Sada pivot 4016	Jaíba	Minas Gerais – BR
28	63		Arinos	Minas Gerais – BR
29	1	Matinha	Nova Porteirinha	Minas Gerais – BR
30	50		Januária	Minas Gerais – BR
31	82	Biojan-MG	Janaúba	Minas Gerais – BR
32	69		Valente	Bahia
33	15	Paciência	Porteirinha	Minas Gerais – BR

...continua...

Tabela 1 Cont.

34	CH1			China
35	CH3			China
36	CB11			Cabo Verde
37	54		Januária	Minas Gerais – BR
38	88	Sada pivot 4005	Jaíba	Minas Gerais – BR
39	CH2			China
40	81	Biojan-MG	Janaúba	Minas Gerais – BR
41	4	Matinha	Nova Porteirinha	Minas Gerais – BR
42	CB0			Cabo Verde
43	10	Paciência	Porteirinha	Minas Gerais – BR
44	CB7			Cabo Verde
45	CB13			Cabo Verde
46	23	Barbosa	Janaúba	Minas Gerais – BR

#### 4. 2. Extração do DNA

O DNA genômico das folhas foi extraído utilizando-se o método proposto por Basha e Sujatha (2007). Cerca de 0,250 g de tecido fresco foi triturado com N<sub>2</sub> líquido em um cadinho com ajuda de um pistilo e incubado a 65 °C por uma hora em microtubos de 2 ml com 800 µL de tampão de extração (2% CTAB, 1,4M NaCl, 20mM EDTA pH8; 100mM Tris-HCl pH 8,0; 3% PVP; 1% β-mercaptoetanol).

O extrato foi submetido a duas extrações com clorofórmio-álcool isoamílico (24:1), e centrifugado por 5 minutos a 14.000 rpm em temperatura ambiente, com posterior transferência do sobrenadante para novos microtubos de 1,5 ml. Os ácidos nucleicos na fase aquosa foram precipitados com isopropanol

na proporção de 1:1 do volume recuperado e incubados a -20 °C *over night* e depois centrifugados por 15 minutos a 14.000 rpm em temperatura ambiente. Em seguida removeu-se o sobrenadante, e o precipitado foi deixado à temperatura ambiente por 15 a 20 minutos para secar. Após a secagem, o precipitado foi lavado uma vez em etanol 70% e uma vez com etanol 95%, para retirar o sal presente.

A partir dessa etapa foi feita uma modificação para a purificação do DNA, proposta por Michaels *et al.* (1994), na qual adicionou-se ao precipitado uma solução de 500 µl (10mM Tris HCl pH 8,0; 0,25 M NaCl) e dissolveu-o ao vórtex. Foi feita a adição 180 µl de etanol absoluto gelado. Em seguida, as amostras permaneceram no congelador *over night*. Após esse período, foram centrifugadas por 20 minutos a 14.000 rpm, a 4 °C. Em seguida, transferiu-se o sobrenadante para um novo tubo onde se adicionou 700 µl de isopropanol. Essa mistura foi mantida por 15 minutos em temperatura ambiente e, em seguida foi centrifugada por 20 minutos a 14000 rpm, a 4 °C. Realizou-se a remoção do sobrenadante e lavagem do precipitado com etanol 70% e etanol 95%. O precipitado foi novamente dissolvido com 200 µL de TE pH 8,0 (10 mM Tris-HCl e 1mM EDTA), contendo RNase na concentração final de 4 µg/ml. A solução ficou incubada em banho-maria a 37 °C por 30 minutos. Após a incubação, adicionou-se NaCl 5M na proporção de 1:10 e 2/3 do volume de isopropanol gelado para precipitação do DNA, que foi incubado novamente a -20 °C, por 2 a 3 horas. Posteriormente foi feita a centrifugação e lavagem do precipitado com etanol 70% e 95%, o mesmo precipitado foi ressuspenso em 200 µL de TE.

Para verificação da qualidade do DNA, utilizou-se um minigel de agarose 0,8%, corado em solução de brometo de etídeo (0,2 mg/L). A quantidade do DNA foi estimada por espectrofotômetro (FEMTO 700 Plus,

FEMTO Ind. e Com. Instrumentos LTDA, São Paulo, SP, BR) a 260/280 nm. A partir de então realizou-se a diluição, mantendo as amostras a 10 ng de DNA/ $\mu$ L.

#### **4. 3. Análise de RAPD**

Para a análise de RAPD, foram utilizados 33 *primers* e as reações de amplificação foram realizadas em termociclador (TECHNE Modelo TC-412, Techne at Barloworld Scientific – Limited, Staffordshire, UK), as quais seguiram a metodologia proposta por Williams *et al.* (1990) com as seguintes concentrações finais: DNA genômico (30 ng/ $\mu$ l); tampão 10X Tris-HCl/KCl (10mM/50mM); MgCl<sub>2</sub> (2,8 mM); dNTPs (0,1 mM); *primer* (5 pmol); Taq DNA polimerase (1 unidade) e água ultrapura para completar 25 $\mu$ l. As amplificações foram efetuadas sob as seguintes condições: um ciclo a 94 °C por 3 minutos; 40 ciclos de 94 °C/15 segundos, 35 °C/30 segundos e 72 °C/1 minuto; ao final desses, um ciclo a 72 °C por 7 minutos e logo após, foi reduzido a 4 °C *forever*. Os iniciadores (*primers*) foram tomados ao acaso e adquiridos do *Kit Operon*®.

Os produtos resultantes das amplificações foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,2%, a 100 V em cuba horizontal (PW300, Biosystems, Comercial Importadoras de Equipamentos para Laboratório LTDA, Curitiba, PR, BR), em tampão TBE (Tris/Borato/EDTA)1X por aproximadamente duas horas e corados em solução de brometo de etídeo a 0,2 mg/L por 15 minutos. Os fragmentos amplificados foram visualizados sob luz ultravioleta e fotografados em sistema digital de Fotodocumentação UVP® *Life Science software* (Ultra-Violet Products LTDA, Cambridge, UK).

#### 4. 4. Análise de ISSR

Foram utilizados 13 *primers* ISSR. Para sua amplificação, utilizou-se o termociclador TECHNE Modelo TC-412. Foram adotadas as seguintes condições para um volume final de 10 µL: DNA (2,5ng); 1µL Tris-HCl pH 8,3 (10 mM/50 mM); MgCl<sub>2</sub> (25 mM); dNTPs (0,2 µM); *primer* (0,4 µM); Taq DNA polimerase (0,6 unidades) e água ultrapura para completar o volume. As reações consistiram em uma fase inicial de desnaturação a 94 °C por 4 minutos, seguida por 35 ciclos de desnaturação (94 °C/30 segundos), anelamento (1 minuto) e extensão (72 °C/2 minutos) e uma fase de extensão final de 72 °C por 7 minutos. Logo após, reduziu-se a 10 °C até a retirada das amostras.

Os *primers* utilizados para a amplificação foram da coleção UBC (*Primers* desenvolvidos pelo Laboratório de Biotecnologia da Universidade Columbia Britânica, coleção nº 9): UBC 812, UBC 829, UBC 834, UBC 867 com temperatura de anelamento (Ta) =50°C; UBC 810, UBC 817, UBC 847, UBC 861, UBC 866, UBC 873, UBC 880, UBC 891 com Ta=55°C; UBC 889, com Ta=58 °C .

Os produtos resultantes da amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,2%, em tampão TBE 1X por aproximadamente duas horas e trinta minutos, corados em solução de brometo de etídeo 0,2 mg/L por 15 minutos. Os fragmentos amplificados foram visualizados sob luz ultravioleta e fotografados em sistema digital de Fotodocumentação UVP® *Life Science software*.

A interpretação dos padrões de bandas exibidas levou em consideração o princípio em que as bandas geradas por um mesmo *primer* e que ocuparem a mesma posição relativa indicam a amplificação do mesmo

fragmento de DNA, ou seja, pertencem ao mesmo loco gênico, enquanto bandas ocupando posições relativas diferentes são de locos distintos. Dessa forma, foi feita uma matriz de dados envolvendo os quarenta e seis genótipos, atribuindo-se valor igual a 1 se a banda homóloga estiver presente e 0, caso contrário.

Os dados obtidos por meio da eletroforese dos *primers* RAPD e ISSR foram registrados na forma de presença (1) e ausência (0) de bandas nos géis fotografados. O cálculo de distância entre os genótipos foi efetuado com base no coeficiente de similaridade de DICE (SORENSO ou NEI e LI) conforme a fórmula abaixo.

$$D_{ij} = S_{ij} = 2a / (2a + b + c)$$

Onde *a* é o número de *locus* comuns aos genótipos *i* e *j*, enquanto *b* e *c* são os números de *locus* presentes apenas em cada um dos genótipos. De acordo com as distâncias genéticas, foi elaborado a partir da análise de agrupamento, um dendrograma utilizando-se Método da Ligação Média entre Grupo (UPGMA) (SNEATH e SOKAL, 1973). Para a análise dos dados obtidos, foi utilizado o programa estatístico Genes (CRUZ, 2006).

## **5. Resultados e Discussão**

### **5.1. Extração de DNA**

Após a quantificação do DNA genômico total em espectrofotômetro, observou-se valor médio para A260 nm/A280 nm de 1,55; caracterizando boa qualidade de DNA e ausência de proteínas e carboidratos. Ferreira e Grattapaglia (1998) recomendam que a relação A260/A280 seja entre 1,2–2,0. A quantidade média de DNA obtido foi de 706,21 ng/μl. Após a quantificação, as amostras foram padronizadas para a concentração de 10 ng/μL.

### **5.2. Análise da diversidade genética**

Para a análise com RAPD foram utilizados 33 *primers* dos quais 24 apresentaram polimorfismo e 9 não apresentaram bandas polimórficas (Tabela 2). A partir da amplificação desses *primers* foi obtido um total de 281 bandas, sendo que apenas 69 (24,5%) delas apresentaram polimorfismo, e 212 bandas (75,5%) apresentaram monomorfismo, demonstrando baixa variabilidade genética entre os genótipos analisados.

A baixa porcentagem de bandas polimórficas também foi observada por Dias *et al.* (2007) que, ao estudarem um *bulk* de 10 plantas de dois genótipos, encontraram somente 24,5% de polimorfismo utilizando 39 *primers* RAPD. Resultados semelhantes foram obtidos também por Rosado *et al.* (2009) que, ao analisarem a diversidade genética de 192 acessos de pinhão-manso, obtiveram com a utilização de 94 *primers* RAPD apenas 23 bandas polimórficas (6,2%). Em trabalho realizado por Souza *et al.* (2009a), 27 *primers* RAPD, geraram apenas 23,7% de bandas polimórficas.

TABELA 2

*Primers* utilizados para análise de RAPD, suas sequências, número total de bandas, número de bandas monomórficas e polimórficas geradas pela amplificação do DNA dos 46 genótipos de *J. curcas* L.

<i>Primer</i>	Sequência 5'___3'	Nº Total de Bandas	Nº de Bandas Monomórficas	Nº de Bandas Polimórficas
OPA06	GGTCCCTGAC	3	2	1
OPA10	GTGATCGCAG	16	14	2
OPB10	CTGCTGGGAC	11	8	3
OPC07	GTCCCGACGA	3	3	0
OPC10	TGTCTGGGTG	12	12	0
OPC14	TGCGTGCTTG	11	10	1
OPC18	TGAGTGGGTG	6	5	1
OPD04	TCTGGTGAGG	11	10	1
OPD07	TTGGCACGGG	5	4	1
OPE05	TCAGGGAGGT	3	3	0
OPF16	GGAGTACTGG	5	5	0
OPF19	CCTCTAGACC	4	4	0
OPG17	ACGACCGACA	7	6	1
OPH11	CTTCCGCAGT	15	5	10
OPH14	ACCAGGTTGG	7	5	2
OPJ15	TGTAGCAGGG	9	5	4
OPJ20	AAGCGGCCTC	11	6	5
OPK01	CATTCGAGCC	9	8	1

... continua...

Tabela 2 Cont.				
OPL03	CCAGCAGCTT	12	12	0
OPM08	TCTGTTCCCC	5	5	0
OPN11	TCGCCGCAAA	9	6	3
OPO10	TCAGAGCGCC	7	7	0
OPP03	CTGATACGCC	8	5	3
OPP09	GTGGTCCGCA	14	11	3
OPU06	ACCTTTGCGG	8	4	4
OPU10	ACCTCGGCAC	8	6	2
OPU19	GTCAGTGCGG	7	4	3
OPV08	GGACGGCGTT	8	4	4
OPV15	CAGTGCCGGT	8	5	3
OPV17	ACCGGCTTGT	12	8	4
OPY20	AGCCGTGGAA	13	7	6
OPW02	ACCCCGCCAA	8	8	0
OPW17	GTCCTGGGTT	6	5	1
Total		281	212	69

Todos os 13 *primers* ISSR apresentaram polimorfismo nos 46 genótipos avaliados. De um total de 189 bandas, 37 (19,9%) foram polimórficas e 149 (80,1%) monomórficas revelando alto nível de similaridade genética entre os acessos estudados. (Tabela 3).

Utilizando 11 *primers* ISSR, Souza *et al.* (2009b) também obtiveram baixa porcentagem de polimorfismo, 23,09%. Entretanto, Ram *et al.* (2008), ao analisarem a diversidade genética de diferentes espécies de pinhão-mansão, obtiveram 80,2% de polimorfismo. Esse resultado indica que, apesar da

diversidade intraespecífica ser baixa, a diversidade entre espécies é alta, o que sugere a busca de variabilidade genética entre espécies de *Jatropha*.

TABELA 3

*Primers* de ISSR, sequências, número total de bandas, número de bandas monomórficas e polimórficas geradas pela amplificação do DNA dos 46 genótipos de *J. curcas* L.

<b>Primer</b>	<b>Sequência 5'__3'</b>	<b>Nº Total de Bandas</b>	<b>Nº de Bandas Monomórficas</b>	<b>Nº de Bandas Polimórficas</b>
UBC810	GAGAGAGAGAGAGAGAT	12	7	5
UBC812	GAGAGAGAGAGAGAGAA	18	15	3
UBC817	CACACACACACACAAA	8	5	3
UBC829	TGTGTGTGTGTGTGTGC	12	7	5
UBC834	AGAGAGAGAGAGAGAGYT	18	12	6
UBC847	CACACACACACACARC	12	10	2
UBC861	ACCACCACCACCACCACC	16	15	1
UBC866	CTCCTCCTCCTCCTCCTC	8	7	1
UBC867	GGCGGCGGCGGCGGCGGC	16	15	1
UBC873	GACAGACAGACAGACA	14	11	3
UBC880	GGAGAGGAGAGGAGA	16	12	4
UBC889	DBDACACACACACACAC	19	17	2
UBC891	HVHTGTGTGTGTGTGTG	17	16	1
<b>Total</b>		<b>189</b>	<b>149</b>	<b>37</b>

De posse dos resultados das amplificações, foram geradas, pelo coeficiente de similaridade de DICE, matrizes de distância genética para cada

marcador, e uma matriz conjunta, todas apresentaram comportamento semelhante quanto à formação de grupos observando como característica a dissimilaridade, assim, será adotada para discussão, apenas a matriz conjunta.

A matriz de distância genética (APÊNDICE A), gerada pelo coeficiente de Similaridade de DICE, revelou variação de distância genética mínima de 1,26% entre os genótipos 4 (Nova Porteirinha-MG) e 81 (Janaúba-MG), justificável pela proximidade física dos locais de coleta entre esses acessos e máxima de 76,15% entre os genótipos CB7(Cabo Verde) e 71(SADA – Jaíba-MG). A distância geográfica entre as duas origens constitui um argumento capaz de justificar a grande dissimilaridade entre estes acessos; contudo, ao observar a distância média de 20,90% entre todos os acessos, verifica-se que os genótipos, de maneira geral, são muito similares, apresentando uma baixa diversidade genética.

Rosado *et al.* (2009) encontraram padrão de distância semelhante, com uma variação de 0 a 86% e distância média de 11% em 192 acessos coletados em diferentes regiões do Brasil. Moreira *et al.* (2009), mesmo com a utilização de marcadores microssatélites, que são codominantes, ou seja, são capazes de distinguir indivíduos homocigotos de heterocigotos, conseguiram encontrar valor máximo para divergência genética em genótipos de *J. curcas*, de apenas 28%. Estes resultados são controversos aos obtidos por Ram *et al.* (2008) que encontraram divergência genética significativa de 80,2% de bandas polimórficas entre genótipos de *jatropha*. Porém, é importante ressaltar que foram utilizadas no trabalho 8 diferentes espécies de *Jatropha*, o que implica a relevante importância de selecionar, para programas de melhoramento, espécies selvagens deste gênero.

Através da análise de agrupamento pelo Método da Ligação Média entre Grupo (UPGMA), foi obtido um dendrograma (Figura 1). Em sua análise, constatou-se de uma forma geral a formação de dois diferentes agrupamentos,

um deles constituído pelos genótipos 86, 71 e 83, todos provenientes da SADA. Estes foram apenas coletados nos campos de produção da empresa (Existem relatos verbais indicando que os mesmos são de origem mexicana). Ao se subdividir este grupo, verificou-se que o genótipo 86 permanece isolado, enquanto que os genótipos 83 e 71 permanecem agrupados com grau de similaridade em torno de 64%. O outro grande grupo formado pelos 43 genótipos restantes (93,48% da população analisada) subdividiu-se em três subgrupos, um contendo isolado o genótipo CB7, oriundo de Cabo Verde, outro formado pelos genótipos 27 a 30, este agrupa somente materiais coletados no Brasil, e um terceiro subgrupo composto pelos genótipos 54 a 81 de diferentes origens, mas que foi capaz de agrupar os que tiveram origem na China.

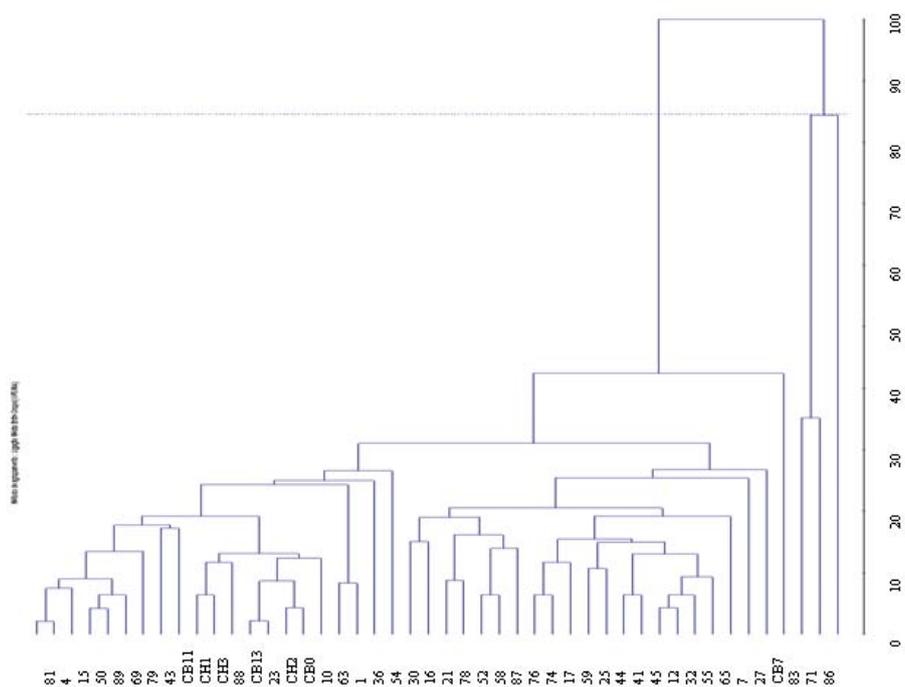


FIGURA 1. Dendrograma (UPGMA) dos genótipos de pinhão-manso, a partir da análise conjunta dos *primers* RAPD e ISSR.

Mesmo verificando-se a formação de um subgrupo capaz de agrupar os genótipos oriundos da China, a alta similaridade constatada neste subgrupo (superior a 70%) evidencia a baixa diversidade genética entre os genótipos das mais diferentes origens.

A formação de um grupo principal, contendo a maior parte dos genótipos, reforça o conceito de que genótipos de pinhão-manso de diferentes regiões do mundo e do Brasil possuem uma ancestralidade comum, excluindo a ideia de diversidade genética por origem. Resultados semelhantes foram observados no estudo de diversidade genética realizado por Oliveira *et al.* (2007), com 24 genótipos de diferentes regiões do Brasil. A partir de marcadores RAPD, esses autores verificaram a formação de quatro grupos distintos independentemente da origem dos genótipos. Ao caracterizarem, via marcadores RAPD e microssatélites, 48 genótipos de pinhão-manso provenientes de diferentes regiões da Índia e um proveniente do México, Basha e Sujatha (2007) constataram que 83% dos acessos indianos caracterizados agruparam-se em dois grandes grupos, enquanto o acesso do México formou um grupo unitário. Sun *et al.* (2008), com a utilização de 17 marcadores microssatélites, não conseguiram separar 58 genótipos chineses analisados. Ao estudarem genótipos de *J. curcas* de diversas regiões do mundo, Basha *et al.* (2009) verificaram apenas dois agrupamentos, um contendo genótipos da região da América Central, e o outro formado por genótipos de outras regiões do mundo.

Ranade *et al.* (2008), ao utilizar marcadores RAPD e AFLP em análise de acessos selvagens e de coleções de *J. curcas* L., da Índia, concluíram que os selvagens se mostraram mais distantes de todos. Isso indica que a inclusão de acessos selvagens numa análise de distância genética pode revelar maior dissimilaridade, visto que estes não sofreram intervenção humana capaz de estreitar a base genética.

O pinhão-manso é uma espécie monoica, assim, é esperado que seus locos estejam em heterozigose, devido à sua predisposição para ocorrência de alogamia. No entanto, em estudo realizado por Rosado *et al.* (2009), com exceção de um loco, todos os locos microssatélites analisados foram homozigotos. Sun *et al.* (2008) também verificaram homozigose para 16 pares de *loci* de SSR em 58 acessos de pinhão-manso na Índia.

Apesar de os marcadores utilizados neste trabalho não serem capazes de diferenciar indivíduos homozigotos de heterozigotos, o presente trabalho e outros estudos realizados com outros tipos de marcadores dominantes e também codominantes evidenciam a baixa diversidade genética entre acessos de pinhão-manso. Caracterizada pela formação de um grupo concentrando muitos acessos e outro concentrando poucos acessos, neste trabalho houve a formação de um grupo com 43 acessos e outro com 3. A baixa variabilidade genética apresentada pode ser atribuída a poucas introduções iniciais deste material tanto no Brasil como em outras partes do mundo, sendo que tal problema pode ainda ter sido agravado pela sua difusão, essencialmente, através de propagação vegetativa.

Apesar de ser considerada uma planta alógama, não se deve descartar as chances de ocorrência de autofecundação em pinhão-manso, ou até mesmo de apomixia. Em um experimento com polinização de *Jatropha curcas* na Índia, Bhattacharya *et al.* (2005) observaram cerca de 32% de apomixia. No Brasil, estudos realizados por Juhasz *et al.* (2009) com planta de pinhão-manso em condições de semiárido revelaram uma taxa de 5% de frutos apomíticos e de 20% por autofecundação natural. Devido às análises em outros trabalhos indicarem ainda grande porcentagem de indivíduos em homozigose, suspeita-se que acessos de pinhão-manso presentes no Brasil e em outros países estejam se reproduzindo, preferencialmente, por autogamia. A ocorrência de plantas isoladas, como ocorre no Brasil, pode facilitar este processo.

No programa de melhoramento desta espécie, para obtenção de ganhos genéticos, é indispensável a introdução de materiais provenientes de outros países, principalmente do centro de origem e/ou diversidade da espécie. Um programa de melhoramento para o pinhão-manso objetiva criar cultivares que apresentem ausência de toxidez, maior produtividade em grãos e com alto teor de óleo, abertura de flores masculinas e femininas em sincronia, tolerância a doenças, seca e também insetos-praga, além de outras características. Contudo, não se deve esquecer de que a obtenção de ganhos genéticos que atendam a estes objetivos depende diretamente da presença de variabilidade genética. Devido à baixa variabilidade genética observada, há uma necessidade imediata de se estudar meios para alargar a base genética de *J. curcas* por meio de seleção de genótipos superiores, mutagênese ou hibridação interespecífica e poliploidia.

## **6. Conclusão**

Os marcadores RAPD e ISSR permitem detectar baixa variabilidade genética entre os genótipos de pinhão-mansão analisados, indicando a necessidade de se alargar a base genética desta espécie.

Os indivíduos mais divergentes, 86, 71 e 83, podem ser indicados para serem utilizados em hibridações futuras no programa de melhoramento genético do pinhão-mansão, pois são os que apresentam maior capacidade de geração de progênie com elevada expressão heterótica, devendo-se, é claro, aliar estas características com caracteres de interesse agrônômico também.

## 7. Referências bibliográficas

AKER, C. L. **Growth and reproduction of *Jatropha curcas* 1997**. Disponível em: <<http://www.jatropha.de/conferences/abstracts-Jatropha97.htm>>. Acesso em 13 abr. 2007.

BARBOSA-NETO, J. F.; BERED, F. Marcadores moleculares e diversidade genética no melhoramento de plantas: In: MILACH, S. C. K. (Ed.) **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre: UFRGS, 1998. p. 29-40.

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

BASHA, S. D. *et.al.* A comparative study of biochemical traits and molecular markers for assessment of genetic relationships between *Jatropha curcas* L. germplasm from different countries. **Plant Science**, Limerick, v. 176, p. 812-823, 2009.

BHATTACHARYA, A. *et al.* Floral biology, floral resource constraints and pollination limitation in *Jatropha curcas* L. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 8, p. 456-460, 2005.

BIODIESEL. Brasília: SEBRAE, 2007. 61 p. Disponível em: <[http://www.biodiesel.gov.br/docs/Cartilha\\_Sebrae.pdf](http://www.biodiesel.gov.br/docs/Cartilha_Sebrae.pdf)>. Acesso em: 12 abr. 2010.

BORÉM, A.; CAIXETA, E. T. **Marcadores moleculares**. Viçosa: UFV, 2006. 374 p.

BRASIL. Ministério da Indústria e Comércio. **Produção de combustíveis líquidos a partir de óleos vegetais**. Brasília: MIC, 1985. 364 p.

CAMPOS, A. **Consolidação da cadeia produtiva do biodiesel**. Disponível em: <<http://www.fbb.org.br/portal/pages/publico/expandir.fbb?codConteudoLog=1294>>. Acesso em: 24 mar. 2006.

CARVALHO C. R. *et al.* Genome size, base composition and karyotype of *Jatropha curcas* L. an important biofuel plant. **Plant Science**, Limerick, v. 174, p. 613-617. 2008.

CRUZ, C. D. **Programa genes**: aplicativo computacional em genética e estatística. Viçosa: UFV, 2006. 442 p.

DIAS, L. A. S., *et al.* Variabilidade genética de pinhão-mansão plantado na região de Viçosa, MG, Brasil. In: CONGRESSO DA REDE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE BIODIESEL, 2., 2007, Brasília. **Anais...** Brasília: MCT/ABIPTI, 2007. p. 1-5.

DIVAKARA. B. N. *et al.* Biology and genetic improvement of *Jatropha curcas* L.: a review. **Applied Energy**, London, v. 87, p. 732-742, 2010

FEDERIZZI, L.C. Estrutura de um programa de melhoramento de plantas e possíveis aplicações de marcadores moleculares: visão do melhorista. In: MILACH, S. C. K. (Ed.) **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre: UFRGS, 1998. p. 3-16.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPLAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEM, 1998. 220 p.

GOIS, I. B. *et al.* Caracterização isoenzimática de acessos de pinhão-mansão (*Jatropha curcas* L.). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA, 2., 2006. Aracaju. **Anais...** Aracaju, 2006. 1 CD-ROM.

GOLDEMBERG, J. Ethanol for a sustainable energy future. **Science**, v. 315, p.

808-810, 2007.

GONÇALVES, N. P. *et al.* Cultura da mamoneira. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 26, n. 229, p. 28-32, 2005.

GRATTAPAGLIA, D. Marcadores moleculares em espécies florestais: *Eucaliptus* como modelo. In: NASS, L. L. *et al.* (Ed.). **Recursos genéticos e melhoramento**: plantas. Rondonópolis: Fundação MT, 2001. p. 967-1010.

HEIFFIG, L. S.; CÂMARA, G. M. S. Potencial da cultura do pinhão-manso como fonte de matéria-prima para o Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel. In: CÂMARA, G. M. S.; HEIFFIG, L. S. (Org.). **Agronegócio de plantas oleaginosas**: matérias-primas para biodiesel. Piracicaba: ESAL, 2006. p. 105-121.

HENNING, R. K. **Combating desertification**: the jatropha project of Mali, West Africa. Disponível em:  
<<http://www.ag.arizona.edu/OALS/ALN/aln40/aln40doc.html>>. Acesso em: 19 ago. 2006.

JONGSCHAAP, R. E. E. *et al.* Claims and Facts on *Jatropha curcas* L. **Plant Research Internacional**, Wageningen, 2007. 66 p.

JUHÁSZ, A. C. P. *et al.* Biologia floral e polinização artificial de pinhão-manso no norte de Minas Gerais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira (Online)**, v. 44, p. 1073-1077. 2009. Disponível em:  
<<http://webnotes.sct.embrapa.br/pdf/pab2009/09/44n09a01.pdf>>. Acesso em: 10 abr. 2009.

JUHÁSZ, A. C. P. *et al.* Parâmetros genéticos e ganho com a seleção para populações de pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.). **Pesquisa Florestal Brasileira (Online)**, v. 30, n. 61, p. 25-35, 2010. Disponível em:  
<<http://www.cnpf.embrapa.br/pfb/index.php/pfb/article/download/83/105>>. Acesso em: 10. abr. 2009.

LIN, J. et al. Antitumor effects of curcumin from seeds of *Jatropha curcas*. **Acta Pharmacologica Sinica**, Beijing, v. 24, n. 3, p. 241-246, 2003.

LUO, M. J. et al. Expression, purification and anti-tumor activity of curcumin. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, Shanghai, v. 38, n. 9, p. 663-668, 2006.

MICHAELS, S. D., et al. Removal of polysaccharides from plant DNA by ethanol precipitation. **Biotechniques**, Natick, v. 17, p. 274-276, 1994.

MIRAGAYA, J. C. G. Biodiesel: tendências no mundo e no Brasil. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 26, n. 229, p. 7-13, 2005.

MOHAMMADI, S. A.; PRASANNA, B.M. Analysis of genetic in crop plants: salient statistical tools and considerations. **Crop Science**, Madison, v. 432, p. 1235-1248. 2003.

MOREIRA, L. L. et al. Caracterização molecular de acessos de pinhão-mansão (*Jatropha curcas* L.). In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 18., ENCONTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO E MOSTRA CIENTÍFICA, 11., 2009, Pelotas. **Anais...** Pelotas: Editora Universitária, 2009. 1 CD-ROM.

OLIVEIRA, A. S. et al. Diversidade genética entre acessos de *Jatropha* sp. In: CONGRESSO DA REDE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE BIODIESEL, 2., 2007, Brasília. **Anais...** Brasília: MCT/ABIPTI, 2007, 451 p.

PEIXOTO, A. R. **Plantas oleaginosas arbóreas**. São Paulo: Nobel, 1973. p. 282.

PERSSONI, L. A. **Estratégias de análise da diversidade em germoplasma de cajueiro (*Anacardium spp* L)**. 2007. 159 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento)-Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007.

PICOLI, E. A. T.; *et.al.* Divergência genética entre árvores matrizes de *Eucalyptus urphylla* e *E. grandis* por meio de análise de RAPD. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, 1., 2001, Goiânia. **Anais...** Goiânia: SBMP, 2001. 1 CD-ROM.

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

RAM, S. G. *et al.* Genetic diversity among *Jatropha* species as revealed by RAPD markers. **Genetics Resources and Crop Evolution**, n. 55, p. 803-809, 2008.

RANADE, S. A. *et al.* Easy assessment of diversity in *Jatropha curcas* L. plants using two single-primer amplification reaction (SPAR) methods. **Biomass and Bioenergy**. v. 32, p. 533-540. jan. 2008.

RAMOS, L. P. *et al.* Biodiesel. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, n. 31, p. 28-37, 2003.

RAO G. R, *et al.* Genetic associations, variability and diversity in seed characters, growth, reproductive phenology and yield in *Jatropha curcas* (L.) accessions. **Trees**, v. 22, n. 5, p. 697-709, 2008.

REIF, J. C.; MELCHINGER, A. E.; FRISCH, M. Genetical and mathematical properties of similarity and dissimilarity coefficients applied in plant breeding and seed bank management. **Crop Science**, Madison, v. 45, p. 1-7. 2005.

ROCHA, D. **Um novo estudo do painel intergovernamental de mudanças climáticas**. Disponível em: <<http://www.ambienteemfoco.com.br>>. Acesso em: 12 nov. 2006.

RODRIGUES, R. Plano Nacional de Agroenergia 2006-2011. **Informe do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**, Brasília, v.1, n. 1,

2005. 120 p.

ROSADO, T. B. *et al.* **Avaliação da diversidade genética do banco de germoplasma de pinhão-manso por marcadores moleculares.** Brasília: Embrapa Agroenergia, 2009. 16 p. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento.

SATURNINO, H. M. *et al.* Cultura do pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.). **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 26, n. 229, p. 44-74, 2005.

SNEATH, P. H. A.; SOKAL, R. R. **Numerical taxonomy.** San Francisco: WR Freeman, 1973. 573 p.

SOUZA, D. A. *et al.* Diversidade genética entre genótipos de pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, 5., 2009, Guarapari. **Anais...** Guarapari: Incaper, 2009a. 1 CD-ROM.

SOUZA, D. A. *et al.* Análise da diversidade genética intrapopulacional de pinhão-manso (*Jatropha Curcas* L.) com marcadores ISSR. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PLANTAS OLEAGINOSAS, ÓLEOS, GORDURAS E BIODIESEL, 6., 2009, Montes Claros. **Anais...** Montes Claros, 2009b, p. 2.158-2.164. 1 CD-ROM.

SOUZA, S. A. C. D. **Avaliação da variabilidade genética em *Musa* spp. utilizando marcadores de microssatélites.** 2002. 86 f. Tese (Doutorado)-Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo. Piracicaba, 2002.

STAUBMANN, R. *et al.* Esterase and lipase activity in *Jatropha curcas* L. **Journal Biotechnology**, v. 75, p. 117-126, 1999.

SUN, Q. B. *et al.* SSR and AFLP markers reveal low genetic diversity in the biofuel plant *Jatropha curcas* in China. **Crop Science**, Madison, n. 48, p. 1865-1870, 2008.

TEIXEIRA, L. C. Produção de biodiesel. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 26, n. 229, p. 79-86, 2005.

WEBSTER, G. L. Euphorbiaceae. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, Saint Louis, v. 81, p. 1-144, 1994.

WILLIAMS, J. G. K. *et al.* DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetics markers. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 18, p. 6531-6535, 1990.

## 8. Anexo A

Matriz de dissimilaridade genética obtida a partir do coeficiente de DICE para a distância conjunta:

acesso	21	87	52	58	30	16	44	41
21		5,15	6,43	7,771	14,12	11,58	10,26	11,58
87			6,35	10,15	12,76	11,49	11,38	15,23
52				3,79	12,72	8,92	7,56	11,38
58					8,89	7,63	6,25	7,58
30						8,92	11,38	12,69
16							10,13	11,44
44								3,77
41								
76								
17								
74								
78								
59								
83								
7								
71								
45								
55								
25								
12								
65								
32								
27								
43								
36								
79								
86								
63								
1								
50								
82								
69								
15								
CH1								
CH3								
CB11								
54								
88								
CH2								
81								
4								
CB0								
10								
CB7								
CB13								
23								

...continua...

Anexo A Cont							
acesso	76	17	74	78	59	83	7
21	14,12	11,55	15,5	5,15	10,36	52,5	15,35
87	16,43	16,39	15,31	14,01	15,31	54,09	16,43
52	15,11	12,56	16,52	12,69	11,44	56,46	13,87
58	11,32	8,78	12,69	11,41	10,15	58,82	15,11
30	11,38	10,1	10,18	11,46	11,49	59,12	18,92
16	17,72	16,43	16,6	12,76	12,79	59,27	17,68
44	7,52	7,5	8,85	12,63	11,38	59,85	12,53
41	8,81	8,78	10,15	13,94	8,87	62,5	16,35
76		5	3,79	12,63	10,1	56,04	15,04
17			8,83	12,59	8,83	54,86	13,77
74				14,01	10,18	53,82	16,43
78					8,92	60,3	12,63
59						56,18	10,13
83							56,18
7							
71							
45							
55							
25							
12							
65							
32							
27							
43							
36							
79							
86							
63							
1							
50							
82							
69							
15							
CH1							
CH3							
CB11							
54							
88							
CH2							
81							
4							
CB0							
10							
CB7							
CB13							
23							

...continua...

Anexo A Cont							
acesso	71	45	55	25	12	65	32
21	59,27	10,28	12,95	9,01	10,28	14,12	11,58
87	64,52	13,94	17,86	12,69	11,41	13,94	13,98
52	61,88	10,1	11,44	8,85	10,1	12,63	10,13
58	59,26	6,31	7,61	7,58	8,83	11,35	6,32
30	59,55	11,41	11,49	11,44	11,41	13,94	11,44
16	60,87	12,69	12,79	12,72	15,23	17,77	12,72
44	60,27	5,03	8,85	8,81	7,54	12,56	7,56
41	61,73	6,31	8,87	7,58	8,83	13,87	8,85
76	57,81	7,54	10,1	11,32	7,54	12,56	10,08
17	56,51	7,52	8,83	8,78	7,52	12,53	10,05
74	57,07	8,87	10,18	10,15	8,87	13,94	11,44
78	60,72	10,13	14,01	11,41	12,66	17,72	12,69
59	58,39	8,87	10,13	6,34	11,41	16,48	11,44
83	20,81	60	61,17	57,6	60	60	57,64
7	60,27	12,56	15,19	12,59	15,08	20,1	15,11
71		57,95	60,87	59,26	60,42	60,42	55,62
45			3,8	6,31	2,52	7,56	2,53
55				6,34	6,34	11,41	6,35
25					6,31	11,35	8,85
12						5,04	5,05
65							7,58
32							
27							
43							
36							
79							
86							
63							
1							
50							
82							
69							
15							
CH1							
CH3							
CB11							
54							
88							
CH2							
81							
4							
CB0							
10							
CB7							
CB13							
23							

...continua...

Anexo A Cont							
acesso	27	43	36	79	86	63	1
21	15,65	23,24	23,02	21,77	58,67	26,75	24,2
87	21,49	21,71	26,42	22,73	61,64	28,89	26,35
52	17,63	21,66	25,06	21,38	56,46	25	22,5
58	13,84	17,81	21,28	17,59	53,82	21,22	18,73
30	15,19	14,01	20,15	15,19	55,28	21,38	18,87
16	16,48	20,41	23,69	22,78	57,93	27,71	25,15
44	13,8	22,78	22,44	18,77	54,86	24,88	22,39
41	15,11	24,14	23,78	20,1	53,83	26,22	23,72
76	16,31	20,25	22,44	18,77	57,36	24,88	21,12
17	15	20,25	21,17	17,5	52,37	21,12	18,63
74	17,72	16,6	23,9	20,2	54,09	23,84	22,56
78	20,2	20,41	27,64	23,96	60,3	30,08	27,57
59	18,96	17,86	23,9	20,2	52,76	22,56	21,33
83	65	66,67	67	63,51	54,46	66,83	54,56
7	20,05	27,78	28,01	25,06	59,85	29,93	27,43
71	60,42	70,81	67,32	63,88	45,25	70,89	68,46
45	10,05	17,77	17,5	13,8	50	19,95	17,46
55	13,91	15,31	18,87	15,15	50,27	17,54	16,31
25	16,35	20,36	23,78	20,1	56,32	23,72	21,22
12	12,56	17,77	17,5	13,8	52,5	19,96	17,46
65	15,08	20,2	20	16,31	55	22,44	18,73
32	10,08	17,81	17,54	13,84	50,13	20	17,5
27		20,25	15,04	16,27	52,37	17,41	12,44
43			11,35	12,66	50,38	15,11	15,11
36				11,21	52,11	17,33	14,85
79					48,57	13,66	11,18
86						50,81	51,98
63							4,94
1							
50							
82							
69							
15							
CH1							
CH3							
CB11							
54							
88							
CH2							
81							
4							
CB0							
10							
CB7							
CB13							
23							

...continua...

Anexo A Cont							
acesso	50	82	69	15	CH1	CH3	CB11
21	16,69	17,9	16,65	19,26	11,58	15,38	16,73
87	20,3	20,15	18,96	24,02	19,01	15,23	17,77
52	16,43	16,31	15,11	17,63	17,68	16,43	16,43
58	12,63	13,53	13,84	13,84	16,39	15,15	15,15
30	13,98	12,63	13,91	15,19	19,06	16,52	10,15
16	20,36	18,96	20,25	20,3	22,9	20,36	15,27
44	16,35	16,25	17,54	17,54	20,1	16,35	18,87
41	17,68	17,54	18,87	18,87	21,44	17,68	20,2
76	16,35	16,23	17,54	20,05	22,61	18,87	21,38
17	12,56	12,47	13,77	16,27	18,82	17,59	20,1
74	17,77	17,63	18,96	17,68	21,55	20,3	19,01
78	18,96	21,38	22,73	22,73	25,32	21,55	16,48
59	15,23	15,11	16,43	15,15	17,72	17,77	17,77
83	60,3	63,35	64,84	64,68	63,67	63,83	67,5
7	22,67	21,28	22,56	22,61	25,15	22,67	22,67
71	63,2	66,18	67,65	65,19	70,28	66,67	64,2
45	11,35	11,26	12,56	12,56	15,11	11,35	16,39
55	10,15	10,08	11,38	10,1	12,66	15,23	17,77
25	15,15	15,04	13,84	16,35	16,39	15,15	15,14
12	11,35	11,26	10,05	15,08	15,11	11,35	16,39
65	13,87	13,77	12,56	17,59	17,63	13,87	18,92
32	11,38	11,29	12,59	12,59	15,15	11,38	16,43
27	16,35	13,73	15,04	15,04	17,59	13,84	18,87
43	7,63	8,85	10,13	10,15	12,72	15,27	10,18
36	8,76	8,7	12,47	12,47	15	13,77	16,27
79	7,54	4,99	8,76	8,76	11,29	10,05	12,56
86	42,71	45,96	47,38	42,39	47,5	48,81	48,81
63	11,24	8,67	12,44	9,95	12,47	16,23	18,73
1	8,74	6,2	9,95	9,96	12,47	13,73	16,23
50		2,51	3,77	6,29	8,83	10,1	12,63
82			3,75	3,75	6,26	7,52	10,03
69				7,52	7,54	8,81	11,32
15					5,03	8,81	8,81
CH1						3,78	11,35
CH3							10,1
CB11							
54							
88							
CH2							
81							
4							
CB0							
10							
CB7							
CB13							
23							

...continua...

Anexo A Cont							
acesso	54	88	CH2	81	4	CB0	10
21	14,16	14,3	14,12	15,42	14,19	12,89	22,16
87	17,81	16,48	17,95	16,52	20,25	17,81	15,31
52	21,55	15,15	19,16	11,41	13,87	19,01	19,06
58	20,25	16,39	17,89	10,13	12,59	17,72	17,77
30	15,31	19,06	19,26	13,94	15,23	19,11	14,05
16	21,71	20,36	23,14	17,77	19,06	20,41	17,9
44	26,48	17,59	19,06	12,59	16,31	18,92	21,49
41	27,89	21,44	19,11	13,91	17,63	17,72	22,84
76	21,44	20,1	20,3	15,11	18,82	21,44	24,02
17	23,9	20,05	21,55	13,84	16,27	21,38	23,96
74	17,81	19,01	20,46	16,52	17,72	22,9	22,96
78	24,14	25,32	24,33	17,77	21,49	24,14	19,11
59	20,3	16,43	20,36	12,72	13,91	17,81	20,41
83	61,33	59,85	61,48	63,39	64,84	61,48	64,15
7	29,08	22,67	25,45	20,1	21,38	25,25	25,32
71	71,78	70,28	66,17	63,04	66,5	66,83	69,48
45	21,47	17,63	14,01	7,58	11,32	16,43	16,48
55	17,77	13,91	15,27	7,63	8,85	17,81	17,86
25	20,25	16,39	16,56	10,13	12,59	17,72	17,77
12	18,96	17,63	14,01	7,58	11,32	16,43	16,48
65	21,49	20,15	14,01	10,1	13,84	16,43	19,01
32	21,55	17,68	14,05	7,59	11,35	16,48	16,52
27	22,73	20,1	16,52	10,08	13,8	18,92	18,96
43	11,49	15,27	15,38	12,69	11,44	20,41	12,79
36	23,84	20	16,43	11,29	13,73	18,82	18,87
79	20,15	16,31	12,69	7,56	10,03	15,11	15,15
86	58,97	52,5	50,51	45,11	46,19	51,44	54,09
63	21,28	17,46	17,63	12,53	11,21	21,28	21,33
1	20	17,46	16,39	10,03	11,21	18,77	18,82
50	17,72	13,87	12,78	5,06	7,56	15,19	15,23
82	15,08	11,26	10,13	3,77	5	12,56	12,59
69	16,39	12,59	11,44	2,52	6,27	13,87	13,91
15	16,39	10,05	10,15	5,05	3,76	13,87	13,91
CH1	11,38	5,04	5,09	5,06	3,77	8,85	8,87
CH3	15,19	8,83	5,1	5,06	7,56	7,59	7,61
CB11	15,19	13,87	12,76	7,56	10,08	12,66	7,61
54		11,38	12,76	13,98	12,63	17,77	10,18
88			6,35	7,59	6,23	8,85	11,41
CH2				5,12	6,35	2,56	5,13
81					1,26	7,61	7,63
4						10,1	10,13
CB0							7,63
10							
CB7							
CB13							
23							

...continua...

Anexo A Cont			
acesso	CB7	CB13	23
21	14,19	15,5	15,5
87	26,96	19,06	20,36
52	25,58	17,72	19,01
58	26,82	16,43	17,72
30	29,6	19,11	20,41
16	30,93	20,41	21,71
44	30,53	20,15	21,44
41	29,37	18,96	20,25
76	33,08	22,67	23,96
17	30,46	20,1	21,38
74	34,66	24,14	25,45
78	33,33	25,38	26,68
59	24,39	16,52	17,81
83	65,82	60,15	61,48
7	33,16	25,25	26,55
71	76,15	67,19	69,31
45	28,06	17,68	16,43
55	26,96	16,52	15,27
25	26,82	16,43	17,72
12	28,06	17,68	16,43
65	28,06	20,2	18,96
32	28,13	17,72	16,48
27	30,53	20,15	18,92
43	30,93	20,41	19,16
36	30,38	20,05	18,82
79	24,14	16,35	15,11
86	60,76	50,13	48,93
63	30,3	20	18,77
1	27,73	17,5	16,27
50	24,27	13,91	12,66
82	21,55	11,29	10,05
69	22,9	12,59	11,35
15	22,9	12,59	11,35
CH1	17,86	7,58	6,32
CH3	19,16	8,85	7,59
CB11	24,27	13,91	15,19
54	26,89	16,8	15,23
88	17,86	7,58	8,85
CH2	14,19	6,39	5,12
81	17,95	7,61	6,35
4	19,11	8,83	7,58
CB0	11,52	3,8	5,08
10	19,26	8,89	7,63
CB7		10,23	11,52
CB13			1,27
23			