

DIVERSIDADE GENÉTICA ENTRE ACESSOS DE *Jatropha* sp.

Andréa dos Santos Oliveira, UFLA, andreas_oliveiras@yahoo.com.br

Itamara Bomfim Gois, DEA/UFS, itamarafloresta@yahoo.com.br

Renata Silva-Mann, DEA/UFS, renatamann@ufs.br

Alessandra de Jesus Boari, EMBRAPA, ajboari@gmail.com

Antônio Carlos Fraga, DAG/UFLA, fraga@ufla.br

RESUMO: Uma das formas de identificação rápida de genótipos para composição de um banco de germoplasma é por meio da técnica de marcadores isoenzimáticos e moleculares. Com o objetivo de avaliar a variabilidade genética de acessos de *Jatropha* sp. Utilizou-se a técnica de marcadores isoenzimáticos e moleculares tipo RAPD. Foram utilizados 14 acessos de pinhão manso de diferentes origens, coletadas folhas jovens e procedido a extração (Isoenzimas) e purificação do DNA (RAPD). Para as isoenzimas a revelação foi feita para os sistemas enzimáticos álcool desidrogenase (ADH), esterase (EST), glutamato oxaloacetato transaminase (GOT) e peroxidase (PO), e na amplificação do DNA foram utilizados 14 oligonucleotídeos, sendo os produtos de amplificação separados em gel de agarose 0,8%, corados com brometo de etídio (0,5 µg/mL) e visualizados sob luz UV. As estimativas das similaridades genéticas (S_{gij}) entre cada par de genótipos foram calculadas pelo coeficiente de Jaccard usando o programa NTSYS-pc versão 2.1. Na análise de isoenzimas, os acessos mais similares foram 1 e 3, com 89% e o mais divergente foi o acesso 13 com 71%. No RAPD houve formação de grupos da espécie *Jatropha curcas* L. E do gênero *Jatropha* sp. O acesso 109 obteve 90% de divergência com os demais acessos. Os grupamentos formados apresentaram origens diversas, sendo possível um estudo de melhoramento visando características agrônomicas desejáveis. Com os marcadores utilizados é possível a caracterização do banco de germoplasma.

Palavras-Chave: Similaridade genética, isoenzimas, RAPD, variabilidade.

1 INTRODUÇÃO

A espécie *Jatropha curcas* L. (pinhão-manso), pertencente à família das Euphorbiáceas, é provavelmente originária do Brasil, mas está distribuída em regiões tropicais de todo o globo; cresce rapidamente em solos pedregosos e de baixa umidade e está sendo considerado uma opção agrícola para o Nordeste brasileiro por ser uma espécie nativa e resistente à seca (ARRUDA *et al.*, 2004). Muitas vezes é cultivada como cerca viva, mas seu maior emprego está na medicina popular. Os produtos obtidos desta espécie são óleo, torta e o sedimento da purificação do óleo. Seu óleo já está sendo empregado como lubrificante em motores a diesel e na fabricação de sabão e tinta. Para Purcino e Drummond (1986) o pinhão manso é uma planta produtora de óleo com todas as qualidades necessárias para ser transformado em óleo diesel.

Para estabelecimento de culturas, aspectos como a caracterização de genótipos é muito importante para poder selecionar aquele com aspectos agrônômicos de interesse econômico, como produção de óleo. Com isso, existe a necessidade de implantação de um programa de melhoramento, e a premissa básica para isto é a conservação de germoplasma. Assim, o conhecimento da variabilidade genética existente nas populações naturais é de fundamental importância para elucidar a biologia, conhecer a densidade e obter informações sobre a evolução das espécies (BRAMMER, 2004), além de informações sobre o sistema de reprodução, diversidade e estrutura genética que são importantes para o estabelecimento de estratégias que visem à conservação das espécies (FREITAS *et al.*, 2004).

Em um banco de germoplasma é importante conhecer a variabilidade dos acessos, pois assim é possível acompanhar a manutenção desta durante a multiplicação dos acessos e melhorar a amostragem dos mesmos (HOSBINO, 2002). Dos vários marcadores disponíveis na atualidade, as isoenzimas pela relativa simplicidade, rapidez e baixo custo das análises em comparação a outros marcadores, têm gerado uma gama enorme de informações protéicas na identificação de espécies, híbridos, populações naturais e cultivadas de diversos organismos vivos (TEIXEIRA *et al.*, 2004). Por isso, mesmo com técnicas moleculares mais modernas, as isoenzimas continuam sendo uma classe muito útil de marcadores em análises genéticas que não requeiram amostragem ampla do genoma (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998). Estes marcadores têm sido utilizados nos estudos de diversidade e distribuição genética (TELLES, 2003), taxa de cruzamento e sistema reprodutivo (OLIVEIRA, 2002), na caracterização de cultivares (LIMA, 2003), entre outros.

O manejo eficiente de germoplasma vegetal é de vital importância para o pesquisador, pois este precisa de uma certa quantidade de germoplasma geneticamente puro e bem caracterizado, para utilizá-lo em suas pesquisas e para o melhoramento genético. Sendo assim, os marcadores baseados no polimorfismo de DNA, como RAPD (polimorfismo de DNA amplificado ao acaso), têm uma aplicação muito importante na administração de recursos genéticos, pois proporcionam dados básicos que são necessários ao melhoramento de plantas ou para o mapeamento de genes (BRETTEING & WIDRLECHNER, 1995). Os marcadores moleculares geram uma grande quantidade de caracteres adicionais fornecendo um quadro de agrupamento dos genótipos e o planejamento de cruzamentos, como, por exemplo, a identificação e discriminação de genótipos, a quantificação da variabilidade genética existente ao nível de sequência de DNA (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1995).

O RAPD (DNA polimórfico amplificado ao acaso) é uma técnica molecular rápida, barata e informativa (WILLIAMS *et al.*, 1990), pois dispensa o conhecimento prévio da sequência de DNA alvo e amplifica as seqüências de DNA a partir de um par de iniciadores de seqüência arbitrária.

Williams *et al.* (1990) mostraram que marcadores moleculares do tipo RAPD podem ser utilizados como marcadores genéticos, uma vez que estes apresentam segregação mendeliana. Dado isto, estes marcadores passaram a ser utilizados para diferentes estudos de genética de população, mapeamento, identificação de fragmentos ligados a genes de interesse e análises de similaridade e distância genética, bem como para a produção de marcas que possibilitaram a correta identificação de acessos de germoplasma vegetal e/ou microrganismos.

Desta forma, o objetivou-se com a presente pesquisa caracterizar as similaridades genéticas de acessos de *Jatropha* sp, por meio da técnica de marcadores isoenzimáticos e RAPD visando à composição de um banco de germoplasma.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Biotecnologia Vegetal – DEA/UFS, nos meses de maio e junho de 2006. Foram utilizados acessos de *Jatropha curcas* L. (Tabela 1) para análise isoenzimática e do gênero *Jatropha* sp. (Tabela 2) para análise de DNA por meio de marcadores RAPD.

Tabela 1 - Acessos de Pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) para avaçiação de isoenzimas. São Cristóvão-SE, UFS, 2006.

| Ordem | Localização | Origem |
|--------------|--------------------|----------------|
| PM 1 | JCUFLA001(01) | Minas Gerais |
| PM 2 | JCUFLA001(02) | Minas Gerais |
| PM 3 | JCUFLA001(03) | Minas Gerais |
| PM 4 | JCUFLA001(04) | Minas Gerais |
| PM 5 | JCUFLA001(05) | Minas Gerais |
| PM 6 | JCUFLA001(07) | Minas Gerais |
| PM 7 | JCUFLA001(08) | Minas Gerais |
| PM 8 | JCUFLA001(09) | Minas Gerais |
| PM 9 | JC010URVGO | Goiás |
| PM 10 | JC011URVGO | Goiás |
| PM 11 | JC012URVMG | Minas Gerais |
| PM 12 | JC013URVGVGO | Goiás |
| PM 13 | JC014URVES | Espirito Santo |
| PM 14 | JC015URVSHGO | Goiás |
| PM 15 | JC024UFS8LAGSE | Sergipe |

Para a extração das isoenzimas foram empregadas 200mg de folhas jovens maceradas com nitrogênio líquido até obter um pó fino e adicionou-se 1mL de tampão de extração (Fosfato de sódio bibásico 0,034 M, sacarose 0,2 M; polivinilpirrolidone 2,56%, brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5 difenil-tetrazólio (MTT) 3 mM, ácido ascórbico 5,7 mM, bissulfito de sódio 2,6 mM, borato de sódio 2,5 mM, β -mercaptoetanol 0,1%, polietilenoglicol-PEG 6000 1%) e 20 μ L de β -mercaptoetanol. A mistura foi acondicionada em microtubos de 2mL e mantida em geladeira ($5 \pm 1^\circ\text{C}$), incubadas no gelo por 12 horas e, posteriormente centrifugadas a 16.000 Xg por 60 minutos a 4°C . O sistema de eletroforese empregado foi o descontínuo com 4,5% (gel concentrador) e 7,5% (gel separador). Nas canaletas foram aplicados 20 μ L do sobrenadante de cada amostra.

A corrida eletroforética foi realizada a 150V, durante 3 horas, a $5 \pm 1^\circ\text{C}$ utilizando-se, para o sistema tampão gel eletrodo Tris-glicina pH 8,9. Os sistemas isoenzimáticos utilizados foram Peroxidase (PO – EC 1.11.1.7), esterase (EST – EC 3.1.1.1), glutamato oxaloacetato transaminase (GOT – EC 2.6.1.1) e Álcool desidrogenase (ADH – EC 1.1.1.7), foram revelados segundo Alfenas (1991). Para a caracterização dos acessos verificou-se a presença, ausência, migração e intensidade de bandas nos géis obtidos. A presença (1) e a ausência (0) de bandas foram utilizadas para construção de matrizes. As estimativas das similaridades

genéticas (Sgij) entre cada par de genótipos foram calculadas pelo coeficiente de Jaccard usando o programa NTSYS-pc versão 2.1.

Para a extração do DNA genômico foram utilizadas folhas previamente maceradas em nitrogênio líquido até a obtenção de um pó fino, que foi extraído com 20mL de tampão CTAB 2X (CTAB 2%p/v, 100mM Tris pH 8,0; 20mM EDTA 0,2M pH 8,0; 1,4M NaCl, 1%PVP-40). Esta mistura foi agitada até homogeneização e incubada a 65°C por 60 minutos. Posteriormente, foi adicionado à mistura 25mL de clorofórmio: álcool isoamílico na proporção 24:1, agitando lentamente e centrifugando a 5000rpm/5 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi coletado e transferido para outro tubo, onde foi adicionado 1mL de álcool 95%: 5% acetato de amônio 7,5M a -20°C, sendo levadas ao freezer por 1 hora. O DNA precipitado foi coletado, levado a outro tubo e adicionado 2,5x o volume de etanol 70%, centrifugando a 10000rpm por 3 minutos até a formação de precipitado. O álcool foi desprezado e o precipitado posto para secar e, a seguir, ressuspendido com 150µL de TE.

A reação de amplificação do DNA apresentou um volume de 25µL, sendo constituída por 14,1µL de água ultra-pura, 3µL de tampão 10X, 0,6µL de dNTP's (10mM), 0,9µL de MgCl₂ (50mM), 0,4µL de *Taq* polimerase (2U), 3µL de primer e 3µL de DNA. Foram testados 14 primers decâmeros de seqüência arbitrária. A amplificação foi realizada utilizando-se termociclador (Biometra/Unisciense) com temperatura inicial de 94°C por 5 minutos, seguida de 45 ciclos de amplificação a 94°C por 1 minutos, 36°C por 2 minutos, e 72°C por 1 minutos. Os produtos de amplificação do DNA foram separados em gel de agarose 0,8%, corados com brometo de etídio (0,5µg/mL), e visualizados sob luz UV. A presença (1) e a ausência (0) de bandas foram utilizadas para construção de matrizes, que foram usadas nas estimativas das similaridades genéticas (Sgij) entre cada par de genótipos, empregando o coeficiente de Jaccard (NTSYS-pc versão 2.1).

Tabela 2 - Acessos de Pinhão (*Jatropha* sp.) utilizados no RAPD. São Cristóvão-SE, UFS, 2006.

| Número | Localização | Coordenadas |
|---------------|--------------------|--------------------|
| 1 | JCUFLA001(01) | Minas Gerais |
| 2 | JCUFLA001(02) | Minas Gerais |
| 3 | JCUFLA001(03) | Minas Gerais |
| 4 | JCUFLA001(04) | Minas Gerais |
| 5 | JCUFLA001(05) | Minas Gerais |
| 7 | JCUFLA001(07) | Minas Gerais |
| 8 | JCUFLA001(08) | Minas Gerais |
| 9 | JCUFLA001(09) | Minas Gerais |
| 10 | JC010URVGO | Goiás |
| 11 | JC011URVGO | Goiás |
| 12 | JC012URVMG | Minas Gerais |
| 13 | JC013URVGVGO | Goiás |
| 14 | JC014URVES | Espírito Santo |
| 15 | JC015URVSHGO | Goiás |
| Lag | JC024UFS8LAGSE | Sergipe |
| 98 | JC016UFSPISE | Sergipe |
| 99 | JC017UFSPISE | Sergipe |
| 101 | JC018UFSPISE | Sergipe |
| 106 | JC019UFSPISE | Sergipe |
| 107 | JC020UFSPISE | Sergipe |
| 108 | JC021UFSPISE | Sergipe |
| 109 | JC022UFSPISE | Sergipe |
| 110 | JC021UFSPISE | Sergipe |
| 113 | JC021UFSPISE | Sergipe |

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observou-se diferenças nos perfis eletroforéticos dos acessos para os diferentes sistemas enzimáticos avaliados. Para a enzima peroxidase (PO) os acessos 6, 7, 8, 9, 10, 11 e 12 apresentaram 1 banda isoenzimática que não diferiu com relação a mobilidade ($R_f = 63,33$); os acessos 6,8 e 12 apresentaram baixa atividade para a enzima. Os acessos 1, 2, 3, 4, 5, 13, 14 e 15 diferiam quanto à mobilidade (63,79; 64,95; 62,25; 66,10; 63,11; 66,66 e 65, 57, respectivamente), e quanto à intensidade para esta enzima.

Para a enzima glutamato oxaloacetato transaminase (GOT) os acessos 13 e 14 não apresentaram atividade. Já os acessos 2 e 3 ($R_f=67,92$), 4 e 5 ($R_f=67,59$), 6 e 7($R_f=69,09$), 1 ($R_f=67,3$), 8 ($R_f=68,18$), 9 ($R_f=67,27$), 10 ($R_f=68,75$), 11 ($R_f=69,64$), 12 ($R_f=67,54$) e 15 ($R_f=66,66$) apresentaram diferenças na migração de bandas e na intensidade das mesmas.

Para a enzima esterase (EST) foram observadas 4 linhas de bandas isoenzimáticas, sendo que apenas o acesso 10 apresentou estas bandas. Os acessos 1, 2, 8, 9 e 15 apresentaram apenas 2 linhas de bandas, sendo que apenas os acessos 1 e 2 ($R_f=20,45; 65,90$) não diferiram quanto a mobilidade e intensidade. Os acessos 3, 4, 5, 6, 7, 11, 12, 13 e 14 apresentaram três bandas com mobilidade e intensidade diferentes.

De acordo com o dendrograma de similaridades genéticas, os acessos que apresentaram maior similaridades foram 1 e 3, com 89% (Figura1). Este dendrograma permitiu a formação de quatro grupos distintos: um com o genótipo 13 que é o mais dissimilar em relação aos outros grupos, com 71% de divergência; outro entre os genótipos 5 e 8, com aproximadamente 60% de divergência; e entre os demais genótipos com aproximadamente 49% de divergência (Figura1).

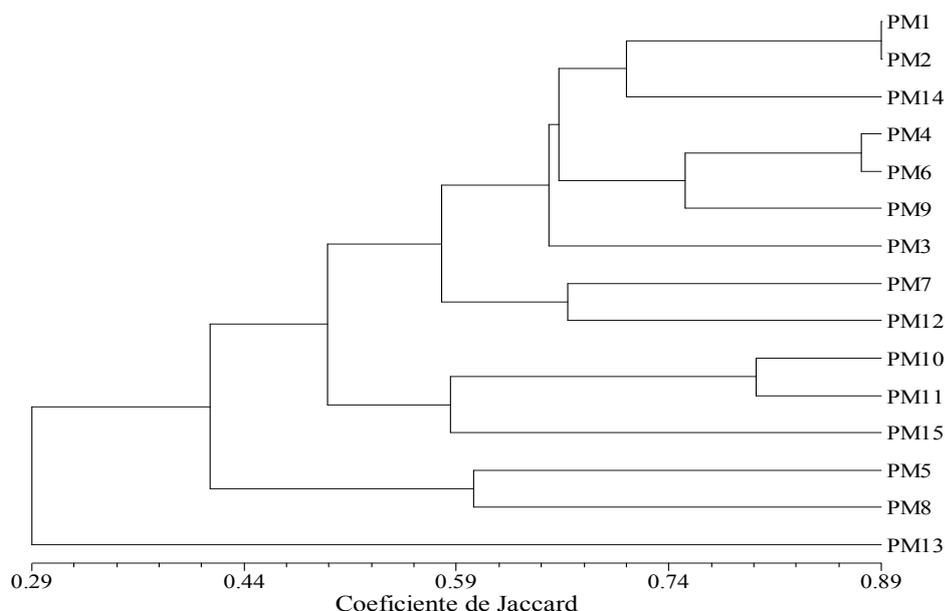


Figura 1 - Dendrograma de estimativas médias de similaridades genéticas entre acessos de *Jatropha curcas* L. (pinhão-manso). São Cristóvão-SE, UFS, 2006.

Considerando a origem geográfica dos acessos, pelo dendrograma, verifica-se que entre os genótipos estudados, houve um agrupamento diferenciado, que pode ser observado entre os acessos 1, 2 e 4 (Minas Gerais para os genótipos 1 e 2 e 14 para Goiás) com similaridades próximas dos 70% e os acessos 10, 11 e 15, localizados em Goiás, Minas Gerais e Sergipe, com 59% de similaridade. Observou-se, portanto que houve maior diversidade entre os acessos provenientes das Minas Gerais, uma vez que eles estão dispostos em quase todos os

4º Congresso Brasileiro de Plantas Oleaginosas, Óleos, Gorduras e Biodiesel

grupos, com exceção do acesso 13 que foi o mais divergente de todos, podendo estes acessos serem explorados em programas de melhoramento genético visando aumento no teor de óleo para produção de biodiesel. Em trabalhos com mandioca por isoenzimas, obsevou-se que agrupando acessos pela origem, houve uma variabilidade maior dentro dos grupos do que entre os mesmos, afirmando a grande variabilidade genética existente entre as espécies, tanto de origem selvagem quanto em sistemas agrícolas tradicionais (Cabral, 2002).

De acordo com as estimativas de similaridades genéticas, os pares de genótipos mais divergentes são 13 e 15, com 12% de similaridade; 8 e 10; 8 e 11; 8 e 13; 11 e 13, com 22% de similaridades; 2 e 5, com 22% de similaridades e 12 e 13, com 25% de similaridade (Tabela 3).

A formação de pares observados na matriz podem ser divididos em grupos: um de 0% a 50% (mais divergentes), de 50% a 75% e de 75% a 100% (mais similares). Os maiores valores de similaridade envolvem os acessos 1, 2, 3, 4, 6, 11 13 e 14, sendo que os maiores valores encontrados pelos pares foram entre os acessos 13 e 10 (90%), 1 e 2 (88%), 4 e 6 (87%), e 10 e 11 (80%). Os pares mais divergentes foram 13 e 15 (88%); 8 e 10, 8 e 11, 8 e 13 (80%); e entre os acessos 7 e 13 (78%) (Tabela 3).

Tabela 3 - Estimativas de similaridades genéticas obtidas de dados isoenzimáticos entre acessos de *Jatropha curcas* L. (pinhão-manso), empregando o coeficiente de Jaccard. São Cristóvão-SE, UFS, 2006.

| Acessos | PM1 | PM2 | PM3 | PM4 | PM5 | PM6 | PM7 | PM8 | PM9 | PM10 | PM11 | PM12 | PM13 | PM14 | PM15 |
|---------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| PM1 | 1.00 | | | | | | | | | | | | | | |
| PM2 | 0.88 | 1.00 | | | | | | | | | | | | | |
| PM3 | 0.66 | 0.72 | 1.00 | | | | | | | | | | | | |
| PM4 | 0.70 | 0.77 | 0.72 | 1.00 | | | | | | | | | | | |
| PM5 | 0.55 | 0.22 | 0.45 | 0.62 | 1.00 | | | | | | | | | | |
| PM6 | 0.60 | 0.66 | 0.63 | 0.87 | 0.71 | 1.00 | | | | | | | | | |
| PM7 | 0.54 | 0.45 | 0.46 | 0.60 | 0.44 | 0.66 | 1.00 | | | | | | | | |
| PM8 | 0.33 | 0.37 | 0.27 | 0.37 | 0.60 | 0.42 | 0.37 | 1.00 | | | | | | | |
| PM9 | 0.58 | 0.63 | 0.61 | 0.80 | 0.50 | 0.70 | 0.63 | 0.30 | 1.00 | | | | | | |
| PM10 | 0.38 | 0.41 | 0.42 | 0.54 | 0.27 | 0.45 | 0.54 | 0.20 | 0.72 | 1.00 | | | | | |
| PM11 | 0.38 | 0.41 | 0.42 | 0.54 | 0.40 | 0.60 | 0.54 | 0.20 | 0.72 | 0.80 | 1.00 | | | | |
| PM12 | 0.60 | 0.66 | 0.50 | 0.66 | 0.50 | 0.55 | 0.66 | 0.42 | 0.70 | 0.60 | 0.45 | 1.00 | | | |
| PM13 | 0.33 | 0.37 | 0.27 | 0.37 | 0.33 | 0.42 | 0.22 | 0.20 | 0.30 | 0.90 | 0.20 | 0.25 | 1.00 | | |
| PM14 | 0.66 | 0.75 | 0.54 | 0.75 | 0.57 | 0.62 | 0.40 | 0.28 | 0.60 | 0.36 | 0.36 | 0.62 | 0.50 | 1.00 | |
| PM15 | 0.50 | 0.55 | 0.41 | 0.55 | 0.37 | 0.44 | 0.40 | 0.28 | 0.45 | 0.66 | 0.50 | 0.62 | 0.12 | 0.50 | 1.00 |

Considerando os acessos mais similares (1, 2, 4, 6, 10, 11 e 13) sendo os mais representativos do conjunto examinado, pode-se sugerir cruzamentos com pares mais

divergentes, como entre os pares 8 com 10, 11 e 13, muito embora estes marcadores não forneçam informações sobre o potencial agrônomo dos descendentes dos referidos cruzamentos.

Na análise de RAPD, com a utilização de 14 oligonucleotídeos, observou-se 36 bandas polimórficas entre os acessos estudados. (Figura 2). A similaridade máxima observada foi de 83% entre os acessos 8 (Minas Gerais) e 10 (Goiás), sendo ambos pertencentes a espécie *J. curcas*. O acesso 109 (Sergipe), pertencente ao gênero *Jatropha*, foi o que mais divergiu, apresentando similaridade igual a 10%, quando comparado aos demais. Os acessos 1, 3, Lag, 8, 10, 9, 13, 11, 12, 4, 5, 14, 2 e 15, de *J. curcas*, mesmo sendo da mesma espécie apresentaram grande diversidade genética (33%).

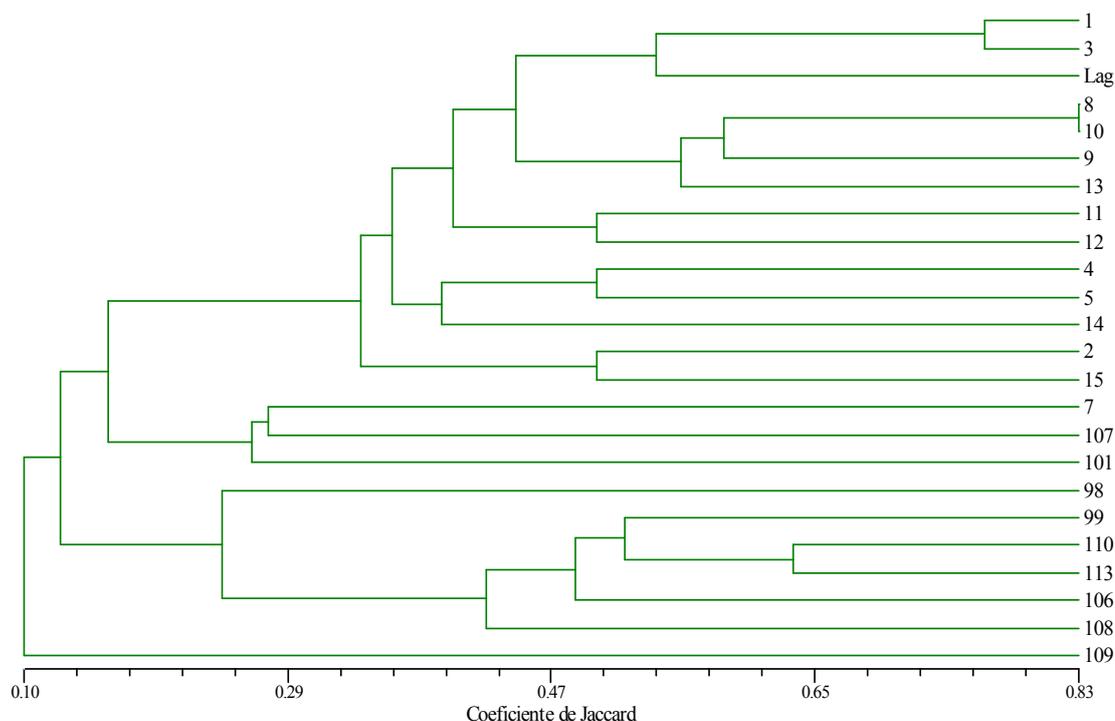


Figura 2 - Similaridade genética entre acessos de *Jatropha* sp. São Cristóvão-SE, UFS, 2006.

Este agrupamento permitiu a formação de quatro grupos distintos: Grupo I entre os acessos 1, 3, Lag, 8, 10, 9, 13, 11, 12, 4, 5, 14, 2 e 15 (31% de similaridade); Grupo II entre os acessos 7, 107 e 101 (27% de similaridade); Grupo III entre os acessos 98, 99, 110, 113, 106 e 108 (25% de similaridade); e o último grupo (Grupo IV) com o acesso 109 (10% de similaridade).

Com a distinção destes grupos, houve agrupamentos com relação a espécie estudada, independente da origem. O grupo I é formado pelos acessos da espécie *Jatropha curcas* L. e o grupo III é formado por acessos do gênero *Jatropha* sp. Dentro do Grupo I, formado por acessos de *Jatropha curcas* L., observam-se pequenos grupamentos entre os acessos e 1, 3 (Minas Gerais) e Lag (Sergipe); 8 (Minas Gerais), 9, 10 (Goiás) e 13 (Espírito Santo); 11 (Minas Gerais) e 12 (Goiás); 4, 5 (Minas Gerais) e 14 (Goiás) e 2 (Minas Gerais) e 15 (Goiás). Como cada subgrupamento possui diferentes origens, mesmo pela proximidade observada pelo dendrograma pode ser que estes materiais sejam utilizados em programas de melhoramento genético, visando melhoria em características agronômicas desejáveis, que com os marcadores utilizados não possam ter evidenciado esta diferença.

Em estudo realizado com pimenta-de-macaco, em quatro populações estudadas, observou-se uma grande variabilidade genética entre os materiais estudados e que acessos originados de uma mesma região podem ser explorados em programas de melhoramento genético para fins agrícolas (Gaia et al., 2004).

4 CONCLUSÃO

A análise isoenzimática permite diferenciar os acessos de *Jatropha curcas* L., independente da origem.

A análise de RAPD permite diferenciar acessos de *Jatropha curcas* L. de acessos do gênero *Jatropha* sp.

Com o uso das duas técnicas é possível a caracterização bioquímica e molecular dos acessos do banco de germoplasma.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALFENAS, A. C.; PETERS, I.; BRUNE, W. e PASSADOR, G. C. **Eletroforese de Proteínas e Isoenzimas de Fungos e Essências Florestais**. Viçosa, SIF, 1991, 242p.

ARRUDA, F. P. de; BELTRÃO, N. E. de M.; ANDRADE, A. P. de; PEREIRA, W. E.; SEVERINO, L. S. Cultivo de Pinhão manso (*Jatropha Curcas* L.) como alternativa para o semi-árido Nordeste. **Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibrosas**. Campina Grande, v.8, n.1, p.789-799, jan-abr. 2004.

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

BRETTING, P.K.; WIDRLECHENER, M.P. Genetic markers and horticultural germplasm management. **HortScience**, v. 30, n. 7, p. 1349-1355, 1995.

CABRAL, B. L. R. ; SOUZA, J. A. ; ANDO, A. ; VEASEY, E. A. ; CARDOSO, E. M. R. . Isoenzymatic variability of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) accessions from different regions in Brazil. **Scientia Agricola**, Piracicaba-SP, v. 59, n. 3, p. 521-527, 2002.

COSTA, R. M.; CARDOSO, E. R.; OHAZE, M.M.M.; Similaridade genética de cultivares de mandioca (*Manihot esculenta*) por meio de marcadores RAPD. **Revista Ciência Agrotecnologia**, Lavras. V.27, n.1, p.158-164, jan./fev., 2003.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA. D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em Análise genética**. 3^a ed. Brasília: EMBRAPA – CENARGEM, 1998, p. 220.

FREITAS, M. L. M.; SEBBENN, A. M.; MORAES, M. L. T. e LEMOS, E. G. M. Mating system of a population of *Myracrodruon urundeuva* F. F. & M.F. Allemão using the fAFLP molecular marker. **Genetics and Molecular Biology**, v.27, n.3, p.425-431, 2004.

GAIA, J.M.D.; MOTA, M.G.C.; CONCEIÇÃO, C.C.C.; COSTA, M.R.; MAIA, J.G.S. Similaridade genética de populações naturais de pimenta-de-macaco por análise RAPD. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.22, n.4, p.686-689, 2004.

HOSBINO, A. A.; PALARIERI, D.A.; BRAVO, J. P.; PEREIRA, T. E. B. e LOPES, G. R. Marcador microssatélite na conservação de germoplasma vegetal. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n.29,2002.

LIMA, M.R.; AUGUSTIN, E.; CHOER, E.; e ROSEIRA, M. do C. B. Caracterização de cultivares de pessegueiro e de nectarineira por marcadores moleculares. **Revista Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.35, n. 3, p.349-355, 2003.

OLIVEIRA, A. F.; CARVALHO, DÚLCINEIA de; e ROSADO, S.C.S. Taxa de cruzamento e sistema reprodutivo de uma população natural de *Copaifera langsdorffii* Desf. na região de Lavras (MG) por meio de isoenzimas. **Revista Brasileira de Botânica**, v.25, n.3, p.331-338, setembro 2002.

PURCINO, A. A. C.; DRUMMOND, O. A. **Pinhão manso**. Belo Horizonte: EPAMIG, 1986. 7p.

TEIXEIRA, A. S.; CHAVES, L.da S.; YUYAMA, K. Esterases no exame da estrutura populacional de Camu-camu (*Myrciaria dubia* (Kunth.) McVaugh- Myrtaceae). **Acta Amazônica**, v.34, p. 89-96, 2004.

TELLES, M. P. de C.; SILVA, R. S. M.; CHAVES, L. J.; COELHO, A. S. G. e FILHO, J. A. F. D. Divergência entre subpopulações de cagaiteira (*Eugenia dysenterica*) em resposta a padrões edáficos e distribuição espacial. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.36, n. 33, p. 1387-1394, 2001.