

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**AVALIAÇÃO DE MARCADORES APLICÁVEIS À DIVERSIDADE
GENÉTICA DE *JATROPHA CURCAS* E ESPÉCIES RELACIONADAS
(EUPHORBIACEAE)**

ANA MARIA SOUZA FELIX

Recife, 2013

ANA MARIA SOUZA FELIX

**AVALIAÇÃO DE MARCADORES APLICÁVEIS À DIVERSIDADE
GENÉTICA DE *JATROPHA CURCAS* E ESPÉCIES RELACIONADAS
(EUPHORBIACEAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, na área de concentração Biologia Celular e Molecular.

Orientadora: Prof^a Dr^a Ana Maria Benko Iseppon

Coorientadora: Prof^a Dr^a Ana Christina Brasileiro Vidal

Recife, 2013

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Felix, Ana Maria Souza

Avaliação de marcadores aplicáveis à diversidade genética de *Jatropha curcas* e espécies relacionadas (Euphorbiaceae)/ Ana Maria Souza Felix– Recife: O Autor, 2013.

62 folhas : il., fig., tab.

Orientadora: Ana Maria Benko Iseppon

Coorientadora: Ana Christina Brasileiro Vidal

**Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco,
Centro de Ciências Biológicas, Biologia Celular e Molecular,
2013.**

Inclui bibliografia e anexos

- 1. *Jatropha curcas* 2. Filogenia 3. DNA I. Iseppon, Ana Maria Benko (orientadora) II. Vidal, Ana Christina Brasileiro (coorientadora) III. Título**

583.69

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB- 2013- 338

“Avaliação de marcadores aplicáveis à diversidade genética de *Jatropha curcas* e espécies relacionadas (Euphorbiaceae)”,

Dissertação de Mestrado apresentada à Coordenação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas, área Biotecnologia

COMISSÃO EXAMINADORA

MEMBROS TITULARES:

Prof^a Dr^a Ana Maria Benko Iseppon (Orientadora)

Prof^a Dr^a Ana Christina Brasileiro Vidal (Membro Externo)

Prof. Dr. Reginaldo de Carvalho (Membro Externo)

MEMBROS SUPLENTE:

Prof^a Dr^a Valesca Pandolfi (Membro Interno)

Prof^a Dr^a Kyria Cyrene de Andrade Bortoleti (Membro Externo)

AGRADECIMENTOS

À Espiritualidade amiga por me proporcionar paz e serenidade para superar os obstáculos no caminho.

À Universidade Federal de Pernambuco e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas pelo propício espaço de novas aprendizagens.

A Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pela concessão da bolsa de estudos.

À Embrapa Algodão e ao Instituto Agrônomo de Campinas pelo fornecimento de material biológico utilizado no presente estudo.

A equipe envolvida nas expedições de campo do LGBV pelas coletas realizadas e ao professor Reginaldo de Carvalho pelo suprimento de *Manihot*.

Ao Rodrigo César pela ajuda com as plantas na casa de vegetação e à Diego Sotero pelo material coletado na Alemanha.

À Heide Lacerda e à Valesca Pandolfi pelo entusiasmo na busca incessante por soluções para dificuldades encontradas na condução dos experimentos.

À Valesca Pandolfi, mais do que ao apoio técnico agradeço pelas palavras de otimismo e perseverança que me fizeram prosseguir.

Ao João Pacífico, Lidianne Amorim e Santelmo Vasconcelos pelas contribuições para o aprimoramento deste trabalho.

Ao João Pacífico agradeço, ainda, pela amizade tranquila e pela solidariedade nos momentos mais difíceis de superar.

A todos os colegas do LGBV, aos quais sem nomear (para não ser injusta), agradeço pelo convívio e bons momentos de descontração. Em especial, agradeço à Silvana Araújo pelo grande laço de amizade construído e a Ísis Raphaella pela afetuosa convivência.

À técnica de laboratório Vanessa Cristina pela pronta vontade em ajudar no decorrer desses últimos anos.

Aos meus colegas de turma, expressivamente à equipe do SICBIO 2011 pelos mais calorosos momentos deste mestrado.

Pelas emoções compartilhadas com os novos amigos feitos no transcorrer desta jornada agradeço, sobretudo, à Priscilla Sales e à Clarissa França.

Com distinta consideração, agradeço, por fim, à minha orientadora Ana Maria Benko Iseppon e à minha coorientadora Ana Christina Brasileiro Vidal por caminharem comigo ao longo desta etapa que hoje concluo.

“Inconstante e Inesquecível, ou quaisquer que sejam as semelhanças...”

Ao meu pai, Jorge Antônio Galindo Felix,

Dedico.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	vi
LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE ABREVIATURAS	viii
RESUMO	x
ABSTRACT	xi
INTRODUÇÃO	12
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
1. A Família <i>Euphorbiaceae</i>	14
2. O gênero <i>Jatropha</i>	15
2.1. Sistemática e Taxonomia	15
2.2. Botânica, Origem e Distribuição	18
2.3. Importância Econômica	19
3. Estudos Genéticos em <i>Jatropha</i>	21
3.1. Citogenética	21
3.2. Marcadores Moleculares e Sequenciamento de DNA	21
3.2.1. Estudos Populacionais	21
3.2.2. Estudos Infragenéricos	23
4. Os Espaçadores Internos Transcritos do DNA ribossomal (ITS)	23
5. Métodos de Análise de Dados Moleculares	25
5.1. Análises Fenéticas	25
5.2. Análises Filogenéticas	26
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27
CAPÍTULO I. Marker development and insight on the genetic variability of <i>Jatropha curcas</i> accessions from Brazilian germplasm	32
CONCLUSÕES.....	55
ANEXOS	56
Anexo I. Instrução para autores: Revista Caatinga	56

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1. Fenograma de 77 espécies neotropicais do gênero <i>Jatropha</i> , com classificação infragenérica	16
Figura 2. Centro de origem e distribuição geográfica de <i>Jatropha</i>	17
Figura 3. Região do DNAr e os espaçadores internos transcritos.....	23

CAPÍTULO I

Figure 1. Phenogram generated by DAF and ISSR polymorphisms using four <i>Jatropha curcas</i> accessions, as compared with two related <i>Jatropha</i> species (<i>J. gossypifolia</i> and <i>J. mollissima</i>). Numbers at the base of the branches regard bootstrap values. Scale bar represents 5% divergence	39
Figure 2. Phenogram generated by DAF and ISSR polymorphisms using 12 <i>Jatropha curcas</i> accessions, as compared with some related <i>Jatropha</i> species. Numbers at the base of the branches regard bootstrap values. Scale bar represents 5% divergence	41
Figure 3. Phenogram generated by ITS sequencing data using 11 <i>Jatropha curcas</i> accessions from IAC (Instituto Agronômico de Campinas) germplasm bank, as compared with some related species. Numbers at the base of the branches regard bootstrap values.....	45
Supplementary Figure 1. Agarose gel (1.2%) illustrating the quality of the extracted DNA from some <i>Jatropha</i> accessions used, as compared with λ Phage DNA as a reference.....	50
Supplementary Figure 2. Agarose gel (1.8%) illustrating amplification products of <i>Jatropha curcas</i> (01-18), <i>J. mollissima</i> (19-20) and <i>J. gossypifolia</i> (21-22) using primers OPL07 (A), OPL11 (B), UBC808 (C) and UBC809 (D) in 22 accessions (not all evaluated due to lack of amplification).....	51

CAPÍTULO I

Table 1. Accessions of <i>Jatropha curcas</i> and related species here studied with their respective accession number and name or provenance and type of markers tested (DAF, DNA Amplification Fingerprinting; ISSR, Inter Simple Sequence Repeat and ITS-1, Internal Transcribed Spacer-1)	37
Table 2. Primers used in the selection step (in six accessions), with their respective sequences, total number of generated bands, as well as polymorphisms on the intra- and interspecific levels. Primers are ordered according to their total number of polymorphism from the higher to the lower amounts. DAF (DNA Amplification Fingerprinting) primers used are ordered from 1 to 13, whereas ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) from 14 to 20	40
Table 3. Primers applied to 17 physic nut accessions including total number of bands (TNB), number of monomorphic bands (NMB) and number of polymorphic bands (NPB), the polymorphism percentage (<i>fi</i>), as well as Polymorphism Information Content (PIC), Marker Index (MI) and Resolving Power (RP) of the primers used.....	42
Supplementary Table 1. Results after BLASTn alignment of the obtained sequences against GenBank (NCBI; http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/). Due to the low quality of some sequences, they have been removed from the final alignment that generated the phenogram	50
Supplementary Table 2. DNA bank available at Universidade Federal de Pernambuco aiming future works with the selected markers and also additional inferences.....	51

LISTA DE ABREVIATURAS

AFLP	<i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i> ; Polimorfismo do Tamanho de Fragmento Amplificado
BAG	Banco Ativo de Germoplasma
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i> ; Ferramenta Básica de Busca por Alinhamento Local
CTAB	<i>Cetyltrimethylammonium Bromide</i> ; Brometo de Cetiltrimetilamônio
DAF	<i>DNA Amplification Fingerprinting</i> ; Impressão Genômica da Amplificação do DNA
DNA	<i>Desoxyribonucleic Acid</i> ; Ácido Desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> ; Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FACEPE	Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco
IAC	Instituto Agrônomo de Campinas
ISSR	<i>Inter Simple Sequence Repeat</i> ; Sequências Entre Repetições Simples
ITS	<i>Internal Transcribed Spacer</i> ; Espaçador Interno Transcrito
MEGA	<i>Molecular Evolutionary Genetics Analysis</i> ; Análises Genéticas da Evolução Molecular
MI	<i>Marker Index</i> ; Índice do Marcador
MP	Máxima Parcimônia
MV	Máxima Verossimilhança
NBM	Número de Bandas Monomórficas
NBP	Número de Bandas Polimórficas
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i> , Centro Nacional para Informação Biotecnológica
NJ	<i>Neighbor-Joining</i> ; Agrupamento por Vizinhaça
NTB	Número Total de Bandas
OP	<i>Operon Technologies</i>

pb	Pares de Base
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> ; Reação em Cadeia da Polimerase
PIC	<i>Polymorphism Information Content</i> ; Conteúdo de Informação Polimórfica
RAPD	<i>Random Amplified Polymorphic DNA</i> ; Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i> ; Ácido Ribonucleico
RNAr	RNA ribossomal
RP	<i>Resolution Power</i> ; Poder de Resolução
SSR	<i>Simple Sequence Repeat</i> ; Sequências Simples Repetidas
TBE	Tris-base, ácido bórico, EDTA
UBC	<i>University of British Columbia</i>
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
UPGMA	<i>Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Means</i> ; Método não polarizado de Agrupamentos aos Pares com Médias Aritméticas

Entre as plantas não comestíveis o pinhão-mansô (*Jatropha curcas* L.) se apresenta como expressiva opção para a obtenção de óleo vegetal, muito demandado para finalidades industriais ou ainda como biocombustível. Apesar da importância de bancos genéticos eficientemente caracterizados para o estabelecimento de programas de melhoramento, os recursos disponíveis para o pinhão-mansô ainda se encontram escassamente caracterizados. No presente trabalho foram testados e desenvolvidos marcadores moleculares para esta cultura, aplicados experimentalmente a acessos de pinhão-mansô em comparação com espécies relacionadas. Os marcadores testados incluíram sete *primers* ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*) e treze iniciadores DAF (*DNA Amplification Fingerprinting*), além do sequenciamento de parte da região ITS-1 (*Internal Transcribed Spacer 1*). Após avaliação de uma subamostra com seis acessos de três espécies de *Jatropha* foram selecionados marcadores para aplicação a um número maior de acesso, sendo obtidos resultados para 12 deles. Os marcadores selecionados envolveram dois ISSR (UBC 808, UBC 809; polimorfismo médio de 78%) e dois DAF (OPL07, OPL11, com média de 44% polimórficos). Por sua vez, as regiões parcialmente sequenciadas de ITS-1 revelaram níveis de polimorfismo escassos entre 10 acessos de pinhão-mansô, além de moderado polimorfismo interespecífico considerando outras espécies de *Jatropha*, indicando que tais marcadores são úteis apenas para comparações interespecíficas ou supragenéricas. Os marcadores desenvolvidos certamente serão úteis para análises de *J. curcas* envolvendo uma maior amostragem, podendo colaborar para a seleção de parentais contrastantes para análises de mapeamento genético, entre outras aplicações.

Palavras-chave: *Jatropha*, sequenciamento de DNA, ITS, filogenia molecular.

Among non inedible plants the physic nut (*Jatropha curcas* L.) figures as an expressive source of vegetable oil, with significant demand for industrial purposes or as biofuel. Despite the importance of efficiently characterized gene banks for the establishment of breeding programs, the resources available for physic nut are still poorly characterized. In this work we tested and developed molecular markers for this culture, applied experimentally to physic nut in comparison with related species. The markers tested included seven ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) primers and thirteen DAF (DNA Amplification Fingerprinting) primers, and sequencing of part of the ITS-1 (Internal Transcribed Spacer 1) region. After evaluation of a subsample with six accessions of three selected *Jatropha* species, markers were selected for application to a larger number of accessions, with results obtained for 12 of them. The selected markers involved two ISSR (UBC 808, UBC 809; polymorphism average 78%) and two DAF (OPL07, OPL11, averaging 44% polymorphic). In turn, the region ITS-1 partially sequenced revealed scarce levels of polymorphism among 10 accessions of physic nut, and moderate interspecific polymorphism considering other *Jatropha* species, indicating that these markers are useful only for interspecific or suprageneric comparisons. The markers developed will certainly be useful for analysis of *J. curcas* involving a larger sample and may contribute to the selection of contrasting parental for genetic mapping, among other applications.

Keywords: *Jatropha*, DNA sequencing, ITS, molecular phylogeny.

A família Euphorbiaceae figura entre as maiores, mais diversas e complexas dentre as angiospermas, sendo a mais numerosa da ordem Malpighiales, com aproximadamente 8.000 espécies e 317 gêneros. Dentre eles, destaca-se *Jatropha*, o segundo maior gênero da subfamília Crotonoideae, o qual congrega 175 espécies, distribuídas em regiões tropicais e subtropicais do planeta, incluindo representantes com ocorrência tanto no novo quanto no velho mundo (Webster, 1994a).

O gênero *Jatropha* é o segundo maior da subfamília *Crotonoideae*, em número de espécies, sendo superado apenas pelo gênero *Croton*. A grande dimensão associada à ampla variação deste gênero reflete em sua importância econômica, sendo *J. curcas* L. – conhecida popularmente como pinhão-mansão – a espécie de maior relevância na atualidade, devido ao seu uso para produção de biodiesel. Apesar desta importância, observa-se uma carência de estudos de melhoramento genético, havendo vários aspectos preocupantes para os melhoristas, como a baixa uniformidade de crescimento e questões relacionadas à arquitetura, ao desenvolvimento e à produção das plantas (Albuquerque *et al.*, 2009). Neste sentido, Argollo *et al.* (2013) destacam que para o sucesso de programas de melhoramento para o pinhão-mansão faz-se necessário um bom conhecimento de sua biologia floral, modelo de reprodução, características da polinização bem como de suas condições fisiológicas, necessárias para o entendimento da fenologia da planta.

A literatura tem reportado uma base genética estreita para a espécie, mediante o emprego de determinados marcadores moleculares, fazendo-se necessários estudos para caracterizar o germoplasma disponível para fins de melhoramento da espécie em nível nacional e internacional (Marques e Ferrari, 2008). A existência de variabilidade genética representa a base do melhoramento genético permitindo o cruzamento de novas combinações de maior interesse para a agricultura. Para tal, é imprescindível o levantamento de informações quanto à diversidade do germoplasma disponível para o estabelecimento de coleções com variação genética representativa de espécies de *Jatropha* (Marques e Ferrari, 2008).

Diversas abordagens têm sido utilizadas em biologia molecular a fim de caracterizar acessos importantes, sejam estes depositados em bancos de germoplasma ou coletados na natureza. Dentre as principais metodologias para geração de marcadores moleculares existentes, as técnicas de DAF (*DNA Amplification Fingerprinting*) e ISSR (*Inter Sequence*

Simple Repeat) destacam-se como importantes ferramentas no estudo da variabilidade genética (Faleiro, 2011).

Os ISSR são marcadores gerados de reações de PCR com um primer único, os quais têm a vantagem de gerar grandes quantidades de bandas, sendo abundantes ao longo do genoma de eucariontes, evoluindo rapidamente. Os marcadores DAF também viabilizam a obtenção de bandas via PCR, e tem se destacado por simplificar as análises genéticas, pois requerem pequenas quantidades de DNA e dispensam o uso de qualquer transferência física (sondas) de material genético (Bodo Slotta e Porter, 2006; Caetano-Anollés, 1991).

Além disso, o conhecimento das relações filogenéticas entre *J. curcas* e outras espécies do gênero pode permitir a identificação de espécies mais próximas e possivelmente úteis em experimentos de hibridação interespecífica, bem como de fontes alternativas de resistência para inferências biotecnológicas. Diversas abordagens moleculares têm sido empregadas para a geração filogenias moleculares em vegetais. No entanto, o sequenciamento de DNA tem se apresentado como uma das melhores maneiras de avaliar diretamente as variações genéticas (Schutz e Wolf, 2009).

Os espaçadores internos transcritos (ITS-1 e ITS-2) têm sido amplamente sequenciados para estabelecer relações de parentesco, pois evoluem rapidamente, apresentando, assim elevados níveis de polimorfismo e são de fácil amplificação devido ao elevado número de cópias. As sequências obtidas são suficientemente longas para oferecer um número de caracteres possível para reconstrução filogenética e são flanqueadas por regiões altamente conservadas dentro dos gêneros (Pamidimarri *et al.*, 2009; Bechara *et al.*, 2010).

Embora o cultivo de *J. curcas* tenha atualmente importância econômica e social, apenas nos últimos trinta anos esta espécie passou a ser estudada, carecendo, ainda, de pesquisas nos mais diversos âmbitos. Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivo caracterizar acessos de *J. curcas* procedentes do Banco de Germoplasma da Embrapa Algodão (Campina Grande-PB) a partir do uso de marcadores DAF e ISSR, bem como avaliar o uso do sequenciamento da região ITS-1 para avaliação da diversidade genética em *J. curcas* usando para este fim amostras do banco genético do IAC (Instituto Agrônomo de Campinas), comparativamente a sequências disponíveis em bancos de dados públicos.

1. A Família Euphorbiaceae

Euphorbiaceae é um dos maiores, mais diversos e complexos grupos das angiospermas, sendo a família mais numerosa da ordem Malpighiales, com aproximadamente 8.000 espécies e 317 gêneros. Considerando as proposições estabelecidas por Webster (1994a), estes gêneros classificam-se em cinco subfamílias: Phyllanthoideae, Oldfieldioideae, Acalyphoideae, Euphorbioideae e Crotonoideae as quais, por sua vez, subdividem-se em 49 tribos. A família apresenta distribuição cosmopolita, embora ocorra preferencialmente nas regiões tropicais e subtropicais, sobretudo nos continentes americano e africano, com exceção de poucos gêneros extratropicais (Webster, 1994a). Estudos fitogeográficos indicam a ocorrência frequente de padrões de distribuição ampla, restrita ou ainda disjunta (Cordeiro e Carneiro-Torres, 2006).

Registros fósseis da família, embora escassos, sugerem que o grupo surgiu há aproximadamente 106 milhões de anos, no período Cretáceo, enquanto que o pico de diversificação remete a 90 milhões de anos (Davis *et al.*, 2005). O foco de origem e variação das euforbiáceas encontra-se na região do Indohimalaia, embora algumas áreas tropicais do novo mundo sejam reconhecidas como *hotspots* de diversidade para esta família (Berry *et al.*, 2005).

Existe uma grande diversidade na forma de crescimento entre os representantes da família, podendo-se identificar desde árvores de florestas tropicais a lianas, arbustos, subarbustos, ervas perenes e anuais ou de hábito aquático. Apenas indivíduos epifíticos não são relatados entre os principais “nichos” de adaptação vegetativa (Webster, 1987).

Com relação à morfologia, a família reúne plantas geralmente latescentes, com folhas alternas, opostas ou (mais raramente) verticiladas, simples de margem denteada, lobuladas ou pmatolobadas, com estípulas livres e frequentemente com glândulas foliares aparentes (Feliu, 2011). Apresenta plantas monoicas ou dioicas, com flores díclinas, sendo pistiladas; frequentemente caracterizadas pelo gineceu sincárpico e ovário súpero, geralmente tricarpelar. O fruto é frequentemente capsular com deiscência explosiva, abrindo-se em três mericarpos (Sátiro e Roque, 2008).

Segundo Caruzo (2010), as Euphorbiaceae apresentam tão expressiva variabilidade morfológica, que apenas flores unissexuais e óvulos providos de obturador placentário foram identificados como características compartilhadas por todos os representantes do grupo. Além da diversidade morfológica, esta família foi considerada por Wurdack *et al.* (2005), como

insuperável em riqueza de espécies e variação fitoquímica dentre todas as famílias da ordem Malpighiales, o que, de acordo com o autor, reflete sua incontestável importância econômica.

Entre as espécies de notável importância econômica destacam-se a mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), uma das principais fontes de amido na alimentação humana; a seringueira (*Hevea brasiliensis* Mull.), principal fonte de borracha natural; a mamona (*Ricinus communis* L.) e o pinhão-manso (*J. curcas* L.), devido ao seu potencial para extração de óleo; a coroa de Cristo (*Euphorbia millii* Desmoul), utilizada em ornamentação e *J. ribifolia* Pohl., empregada na produção de sabões e detergentes (Caruzo, 2010).

Entre as espécies supramencionadas a mandioca e a seringueira são nativas dos neotrópicos. Estima-se que dentre as Euphorbiaceae cerca 1.100 espécies e 72 gêneros ocorram no Brasil, habitando os mais diferentes tipos vegetacionais (Barroso *et al.*, 1991; Souza e Lorenzi, 2008). Um levantamento desenvolvido por Cordeiro e Carneiro-Torres (2006) indicou a presença de 211 espécies e 45 gêneros na região Nordeste do Brasil. Enquanto Barbosa *et al.* (1996), tendo por base informações bibliográficas, estimam a ocorrência de cerca de 500 espécies na mesma região.

Apesar dos diversos estudos desenvolvidos de modo multidisciplinar, envolvendo morfologia, anatomia, fitoquímica, botânica econômica, taxonomia e filogenia, o conhecimento sobre o grupo ainda apresenta lacunas consideráveis, que podem ser atribuídas, sobretudo, à grande amplitude de variação genética e morfológica, bem como ao elevado número de espécies compiladas nesta família (Caruzo, 2010). Sendo assim, conforme proposto por Secco (1990), são necessárias pesquisas adicionais, em especial considerando gêneros de delimitação confusa e interesse relevante, já que caracteres adicionais de natureza morfológica, fitogeográfica e molecular podem contribuir para um melhor entendimento da complexidade e das relações do grupo.

2. O gênero *Jatropha*

2.1. Sistemática e Taxonomia

O gênero *Jatropha* se classifica na subfamília Crotonoideae, que reúne aproximadamente 2.400 espécies, agrupadas em 67 gêneros e 12 tribos. Segundo Webster (1994b), dentre as características compartilhadas pelos representantes deste grupo destacam-se: folhas estipuladas, variando de simples a compostas, alternadas (raramente opostas); sépalas principalmente imbricadas; pétalas e discos geralmente presentes; um óvulo por lóculo e sementes muitas vezes carunculadas.

Uma das características mais importantes considerando-se os táxons desta subfamília é a configuração da exina dos grãos de pólen, denominada de padrão-*Croton* (do inglês “*Croton-like*”), o qual foi definido por Erdtman (1952) e designa os grãos de pólen que apresentam excrescências triangulares ou mais ou menos circulares em seção transversal da exina, suportadas por uma camada baculada, baculoide ou esponjosa (Lima e Pirani, 2008). Sendo assim, a morfologia polínica apresenta evidências decisivas para o estabelecimento de linhas de afinidade filogenéticas entre as 12 tribos da subfamília Crotonoideae, exceto nas tribos mais primitivas, onde não ajudam a esclarecer os problemas de delimitação tribal. Dentre as tribos desta subfamília destaca-se *Jatropheae* a qual reúne sete gêneros, a saber: *Annesijoa*, *Deutzianthus*, *Jatropha*, *Joannesia*, *Leeuwenbergia*, *Oligoceras* e *Vaupesia* (Webster, 1994b).

Para o gênero *Jatropha*, uma característica de importância taxonômica refere-se aos laticíferos. Dehgan e Craig (1978) investigando aspectos histológicos em trinta espécies de *Jatropha*, destacaram a importância taxonômica das estruturas produtoras de látex, a partir da qual foi possível estabelecer a distinção entre o subgênero *Curcas*, com base na presença de células septadas cristalíferas, e sua ausência no subgênero *Jatropha*.

Dehgan e Webster (1979), baseado em dados citológicos e morfológicos, especificamente na morfologia das epidermes (Dehgan, 1980), propuseram uma delimitação para o gênero e estabeleceram a classificação infragenérica, a partir da qual foi determinado que o subgênero *Jatropha* constitui-se de seis sessões e sete subseções, enquanto que *Curcas* apresenta quatro sessões e três subseções, totalizando dez sessões e dez subseções no gênero (Figura 1). O subgênero *Jatropha* é composto pelas seções *Jatropha* (subseções *Adenophora* e *Pubescentes*), *Collenucia*, *Spinosa*, *Peltata*, *Tuberosa* (subseções *Tuberosa* e *Capenses*), *Polymorpha* (subseções *Polymorpha*, *Hernandiifolia* e *Macrorrhiza*); enquanto que o subgênero *Curcas* constitui-se das seções *Curcas*, *Platyphyllae*, *Laureira* (subseções *Laureira*, *Canescentes* e *Neopauciflorae*) e *Mozinna* (Dehgan e Webster, 1979).

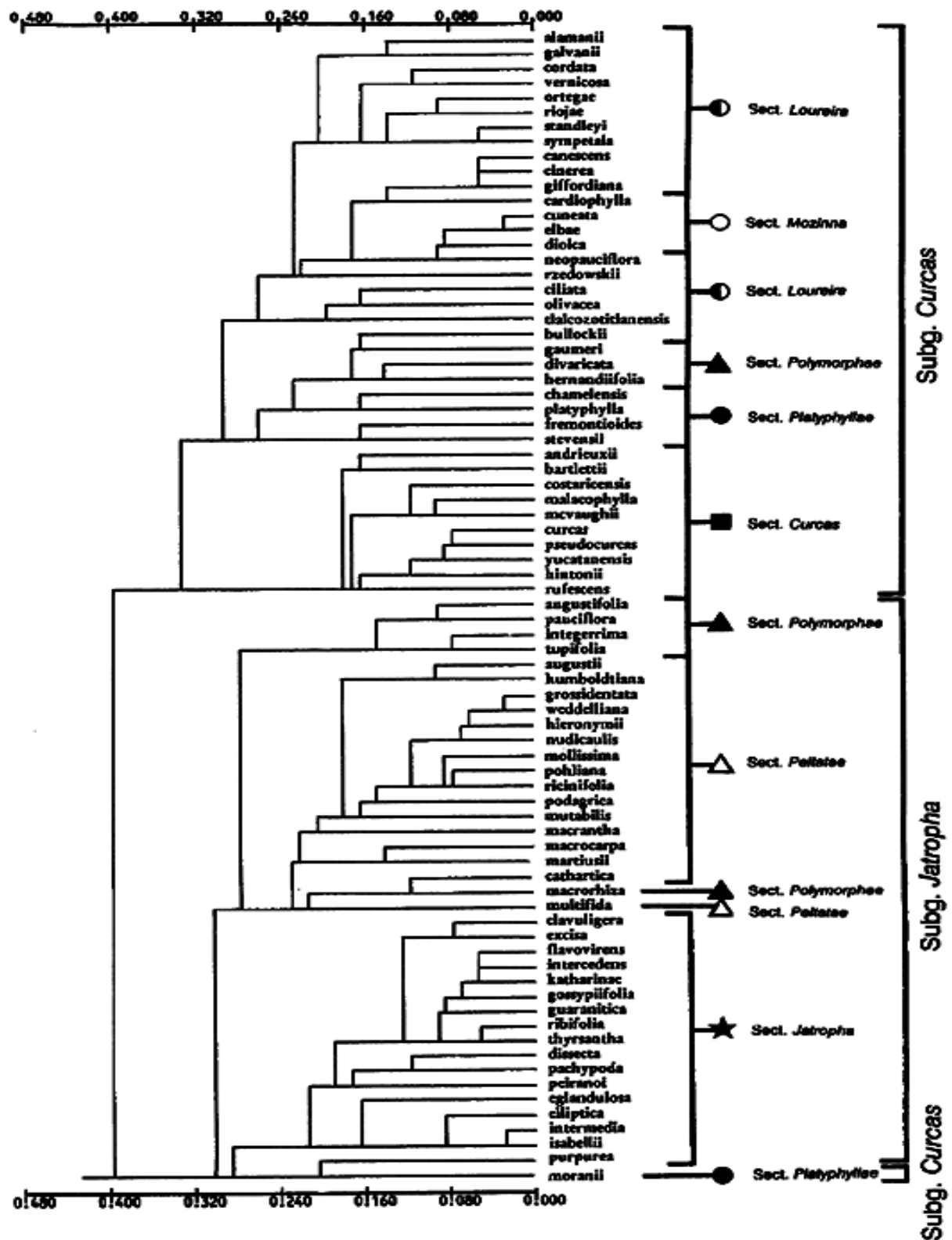


Figura 1. Fenograma de 77 espécies neotropicais do gênero *Jatropha*, com classificação infragenética proposta por Dehgan e Webster (1979), baseado em 32 caracteres morfológicos, usando o programa NTSYS (Fonte: Dehgan e Schutzmann, 1994).

2.2. Botânica, Origem e Distribuição

O gênero *Jatropha* congrega 175 espécies, distribuídas em regiões tropicais e subtropicais em todo o planeta (Sujatha *et al.*, 2008). Segundo Deghan e Webster (1979), o subgênero *Jatropha* apresenta ampla distribuição, com espécies encontradas na África, Índia, América do Sul, Antilhas, América Central e Caribe, enquanto o subgênero *Curcas*, com exceção de apenas uma espécie, *J. curcas*, está restrito ao México e regiões adjacentes (Arizona e Texas).

O centro de origem de *Jatropha* tem sido motivo de controvérsias. Dehgan e Webster (1979) sugeriram *J. curcas* (ou seu ancestral) como a espécie mais primitiva do gênero, a partir da qual outras espécies evoluíram com alterações de hábito de crescimento e das estruturas das flores. Com base nesse pressuposto, pode-se inferir que provavelmente o centro de origem do gênero esteja associado ao centro de origem desta espécie, ou seja, a América Central. Apesar desta proposição, a definição do centro de origem ainda constitui um desafio, tendo em vista da falta de consenso entre especialistas.

Carels (2009) afirma que o fóssil mais antigo do gênero *Jatropha* foi encontrado por Berry (1929), em formações geológicas no Peru. No entanto, segundo Argollo *et al.* (2013) estudos recentes utilizando marcadores moleculares: como RAPD (Ram *et al.* 2008, Gupta *et al.* 2008; Pamidiamarri *et al.* 2009; Ikbale Boora e Dhillon 2010), ISSR (Basha e Sujatha 2007, Kumar e Sharma 2008), AFLP (Tatikonda *et al.* 2009), SSR (Sun *et al.* 2008) e SPAR (Ranade *et al.* 2008) revelaram uma baixa diversidade genética entre a maior parte dos acessos avaliados.

Considerando apenas a espécie *J. curcas*, Heller (1996) afirma ser mais confiável considerar o México (América Central) como possível centro de origem, propondo que com a migração dos índios da América do Norte para a América do Sul há mais de 10.000 anos, tornou-se possível a distribuição desta espécie do México até a Argentina, incluindo o Brasil (Figura 2). Entretanto, Martin e Mayeux (1984) consideraram o Brasil como país de origem de *J. curcas* em virtude de navegantes portugueses terem levado suas sementes colhidas no Brasil para a África, Ásia e Ilhas no Atlântico, onde a espécie não ocorre em vegetação espontânea, mas apenas sob a forma cultivada. Considera-se, portanto que provavelmente a espécie foi introduzida pelos comerciantes portugueses no sudeste da África, Índia, Cabo Verde, Madagascar, Java, Malásia, Tailândia e Filipinas (Sujatha e Dhingra, 1993).



Figura 2. Provável centro de origem e áreas de ocorrência de *Jatropha curcas* (Fonte: Heller, 1996).

No Brasil, segundo Arruda *et al.* (2004), a distribuição geográfica é bastante vasta, devido à sua rusticidade, resistência a longas estiagens e adaptação a condições edafoclimáticas muito variáveis. Sátiro e Roque (2008), estudando a ocorrência de espécies de *Jatropha* no semiárido brasileiro, identificaram a abundante ocorrência de *J. mutabilis*, *J. ribifolia* e *J. mollissima*.

2.3. Importância Econômica

O gênero *Jatropha* é o segundo maior da subfamília *Crotonoideae* com 175 espécies, ficando atrás apenas do gênero *Croton*, que inclui cerca de 1.200 espécies (Lima e Pirani, 2008). A grande dimensão associada à ampla variação de *Jatropha* reflete em sua importância econômica, tendo espécies aproveitadas para diversos fins. O gênero congrega membros com aplicações na medicina, nutrição, agricultura, farmacologia, ornamentação, além da vasta utilização na indústria (Leal e Agra, 2005).

Deste gênero já foram isolados alguns metabólitos secundários, tais como: terpenos, alcaloides e flavonoides, sendo atribuídas a estes agrupamentos químicos várias ações farmacológicas, entre elas as ações hipotensora, diurética, antirreumática, antidiarreica, imunomoduladora e cicatrizante (Correa, 1984). Além disso, alguns trabalhos científicos têm

ênfatisado a presença de diterpenoides macrocíclicos nas raízes das plantas, que apresentam comprovada atividade antileucêmica, antineoplásica e antitumoral (Lorenzi e Matos, 2008).

Na medicina popular, várias espécies se destacam devido às suas aplicações, como por exemplo, *J. curcas*, cujo óleo extraído das sementes é usado como laxante (Dehgan e Webster, 1979), ou ainda o pinhão-roxo (*J. gossypifolia* L.) que é usado para cura de ferimentos diversos. Neste sentido, vale destacar que comprovada atividade cicatrizante também de *J. curcas* e *J. gossypifolia* (Vale *et al.*, 2006). Segundo Bhaskarwar *et al.* (2008), *J. podagrica* Hook além de possuir expressiva importância na medicina tradicional, pode ser empregada na cura de várias infecções.

Alguns trabalhos também relatam atividades moluscicida e inibitória do vírus do mosaico da melancia (*Watermelon Mosaic Virus*, WMV) comprovadas em espécies de *Jatropha*, sendo sua toxicidade atribuída à curcina (Leal e Agra, 2005). Silva (1998), por sua vez, apresentou o uso de *J. ribifolia* na fabricação de sabões e detergentes, enquanto Fröhlich *et al.* (2010) informaram que algumas espécies do gênero também são utilizadas na fabricação de velas, em substituição à parafina.

Algumas espécies também podem ser utilizadas como ornamentais, tais como *J. gossypifolia*, *J. multifida* L. e *J. podagrica*. A fácil propagação das sementes intensificou a utilização destas espécies na horticultura, bem como em ornamentações nos jardins tropicais. Alguns autores relatam a presença de espécies ornamentais, também empregadas como cercas-vivas, em várias partes do mundo, especialmente na África (Leal e Agra, 2005).

No México, destaca-se a ocorrência natural do genótipo atóxico de *J. curcas*, sem presença de ésteres de forbol, propiciando o uso da polpa ou sementes de pinhão-mansinho na alimentação, tradição existente desde a época dos Maias. É interessante observar que não há relatos da ocorrência do genótipo atóxico fora do México (Núñez-Colín e Goytia-Jiménez, 2009).

Dentre todas as espécies do gênero pode-se dizer que *J. curcas* representa a espécie de maior importância econômica do gênero, por apresentar elevado potencial para produção de biodiesel, que é um combustível caracterizado por ser biodegradável e não tóxico (Berchmans e Kirata, 2008). Além disso, *J. curcas* também pode ser utilizada para outros fins, tais como: (a) substituição parcial do arame em cercas vivas, já que os animais evitam tocá-lo devido ao látex cáustico que escorre das folhas arrancadas ou feridas; (b) como suporte para plantas trepadeiras como a baunilha (*Vanilla aromática*), visto que o tronco possui casca lisa e macia e (c) como fixador de dunas na orla marítima, no controle da erosão (Peixoto, 1973). É uma

espécie que apresenta características de produção sustentável, tais como: plantio perene, aptidão para consórcio, boa adaptação às regiões de cultivo, além de agregar valor socioeconômico às comunidades locais e não entrarem em competição com o mercado alimentar (Luís, 2009).

3. Estudos Genéticos em *Jatropha*

3.1. Citogenética

Até o presente momento sabe-se que quase todas as espécies de *Jatropha* são diploides, com $2n = 2x = 22$ cromossomos. As espécies *J. cuneata* Wiggins & Rollins, *J. dioica* Sesse e *J. heterophylla* Heyne são tetraploides ($2n = 4x = 44$), enquanto, *J. tirucalli* L. apresenta $2n = 20$ cromossomos (Soontornchainaksaeng e Jenjittikul, 2003). A maioria dos híbridos interespecíficos artificiais são diploides, com exceção dos híbridos obtidos a partir de cruzamentos entre *J. curcas* × *J. cathartica* Teran & Berlan e *J. curcas* × *J. podagrica* (Dehgan, 1984), que geraram indivíduos triploides ($2n = 3x = 33$).

Considerando *J. curcas*, atualmente a espécie de maior interesse do gênero, Carvalho *et al.* (2008) realizaram estudos onde foi determinado o número de cromossomos, o tamanho do genoma (0,85 pg DNA/2C), o conteúdo de GC (Guanina-Citosina, 38,7%), reportando um cariótipo com cinco pares de cromossomos metacêntricos e seis submetacêntricos, com tamanhos que variaram de 1,24 a 1,71 μm . Os resultados obtidos por Dahmer *et al.* (2009) confirmaram os apresentados por Carvalho *et al.* (2008) em termos de número e tamanho dos cromossomos, bem como sua morfologia. Carvalho *et al.* (2008) sugerem que *J. curcas* seria um autotetraploide, enquanto Dahmer *et al.* (2009) acrescentam que $x = 11$ poderia ser um número básico derivado de eventos de poliploidizações antigas no gênero *Jatropha* ou seus ancestrais, seguidas por rearranjos cromossômicos.

3.2. Marcadores Moleculares e Sequenciamento de DNA

3.2.1. Estudos Populacionais

O uso sustentável dos recursos genéticos vegetais requer a identificação precisa de seus acessos. O desenvolvimento de marcadores baseados em DNA tornou a identificação da

diversidade vegetal mais confiável e isenta de opiniões subjetivas. Muitas técnicas em genética molecular vêm sendo utilizadas para estudar a distribuição e o grau de variação de espécies, além de responder a questões taxonômicas e evolutivas (Arif *et al.*, 2010).

Diversos tipos de marcadores vêm sendo reportados na literatura para estudos envolvendo *J. curcas* em nível intraespecífico, tais como os desenvolvidos por Gupta *et al.* (2008), os quais estudaram a diversidade genética em 13 genótipos de *J. curcas* mediante o uso de 20 marcadores RAPD e 14 ISSR. Tais autores verificaram um percentual de polimorfismo entre 40 e 100%, indicando de moderada a alta diversidade entre os genótipos de quatro diferentes regiões de cultivo na Índia.

Estudos desenvolvidos com 42 acessos *J. curcas* coletados em diferentes regiões da Índia evidenciaram 42% de polimorfismo a partir de 400 marcadores RAPD e 33,5% com 100 marcadores ISSR (Basha e Sujatha, 2007). De maneira oposta, baixa diversidade genética foi evidenciada a partir de marcadores SSR e AFLP, em 58 acessos *J. curcas* utilizados na China, nos quais verificou-se polimorfismo em apenas 14,3% dos marcadores AFLP analisados, sendo que apenas um dos 17 SSR testados foi polimórfico (Sun *et al.*, 2008).

Basha *et al.* (2009) ao analisar 72 acessos de *J. curcas* coletados em 13 países, a partir de marcadores RAPD e ISSR obtiveram 61,8% de polimorfismo com 100 primers RAPD utilizados, enquanto que o polimorfismo verificado em 100 primers de ISSR foi de 35,5%. A partir dos resultados obtidos os autores indicaram a necessidade de explorar o germoplasma da espécie disponível no México, para fins de melhoramento.

Posteriormente, Pamidimarri *et al.* (2010) ao estudar 28 acessos de *J. curcas* cultivados em diferentes regiões da Índia, a partir de marcadores RAPD e AFLP detectaram polimorfismo de 50,70 e 60,95%, respectivamente para os marcadores avaliados. He *et al.* (2007) usando marcadores ISSR relataram percentual de polimorfismo ainda mais elevado, indicando alto nível de diversidade genética entre oito populações cultivadas de *J. curcas*, na China.

Grativol *et al.* (2011) analisando 332 acessos de *J. curcas*, mediante o emprego de sete marcadores ISSR procedentes de diferentes regiões do Brasil, constatou que os acessos brasileiros estão intimamente relacionados, enquanto que acesso coletados em Natal (RN) foram os mais divergentes. Shen *et al.* (2012) utilizaram marcadores AFLP para caracterizar 63 populações procedentes de dez países da África, Ásia e México, cultivadas na China e no Vietnã, identificando 31% de variabilidade interpopulacional e 69% intrapopulacional.

Os contraditórios resultados obtidos mediante o emprego de marcadores moleculares nos estudos aqui relatados deixam evidente a falta de uniformidade do germoplasma de *J. curcas* cultivados em diversas regiões do planeta. Sendo assim, conforme proposto por Basha *et al.* (2009) faz-se necessário buscar ainda mais informações acerca dos padrões de variação genética em acessos desta espécie.

3.2.2. Estudos Infragenéricos

Além dos estudos envolvendo populações, diversos autores utilizam marcadores moleculares para inferir acerca das relações infragenéricas. Basha e Sujatha (2009) utilizaram 34 populações de oito espécies do gênero *Jatropha* (*J. curcas*, *J. gossypifolia*, *J. glandulífera* Roxb, *J. integerrima* Jacq, *J. podagrica*, *J. multifida*, *J. villosa* Wigth e *J. maheshwarrii* Subr. e M.P. Navar) e o híbrido natural *J. tanjorensis* (J. L. Ellis e Saroja) a partir do uso de marcadores, incluindo 200 RAPD, 100 ISSR e 50 SSR, os quais revelaram alta variação genética interespecífica (98,5% de polimorfismo).

Kumar *et al.* (2009) estudaram nove espécies do gênero *Jatropha* (*J. curcas*, *J. tanjorensis*, *J. gossypifolia*, *J. podagrica*, *J. maheshwarrii*, *J. villosa*, *J. multifida*, *J. integerrima* e *J. glandulífera*) e identificaram 98,14% de polimorfismo entre as espécies, a partir de marcadores ISSR. Enquanto Ram *et al.* (2008) verificaram 80,2% de polimorfismo entre 12 espécies de *Jatropha*, mediante o emprego de 26 marcadores RAPD.

Tanya *et al.* (2011) verificaram a diversidade genética baseado em marcadores ISSR de 36 acessos de quatro espécies de *Jatropha* (*J. curcas*, *J. integerrima*, *J. gossypifolia* e *J. podagrica*), revelando 63% de variabilidade entre as espécies. Por sua vez, Pamidimarri *et al.* (2009) estabeleceram relações filogenéticas entre *J. curcas*, *J. glandulífera*, *J. gossypifolia*, *J. integerrima*, *J. multifida*, *J. podagrica* e *J. tanjorensis* a partir de marcadores RAPD e AFLP, tendo encontrado 97,74 e 97,25% de polimorfismo, respectivamente.

A utilização de tais técnicas para caracterização de germoplasma permite inferir, a partir do padrão global de agrupamento, quanto à correlação entre estes táxons e a diversidade genética observada. Além disso, facilita a conservação e utilização dos recursos genéticos de plantas, devido ao estabelecimento de relações filogenéticas entre as espécies (Ramet *et al.*, 2008; Pamidimarri *et al.*, 2009).

4. Os Espaçadores Internos transcritos do DNA ribossomal (ITS)

Diversas abordagens moleculares têm sido empregadas para estabelecer relações de parentesco entre as espécies vegetais. No entanto, tem-se considerado que o sequenciamento de determinadas regiões DNA compreende uma das melhores maneiras de avaliar diretamente as variações genéticas entre os táxons examinados. Dentre as abordagens utilizadas para inferências filogenéticas destaca-se o sequenciamento dos espaçadores internos transcritos (ITS-1 e ITS-2), regiões do DNA nuclear ribossomal, que estão localizadas entre os genes 18S e 5.8S (ITS-1) e 5.8S e 26S (ITS-2) (Baldwin *et al.*, 1995).

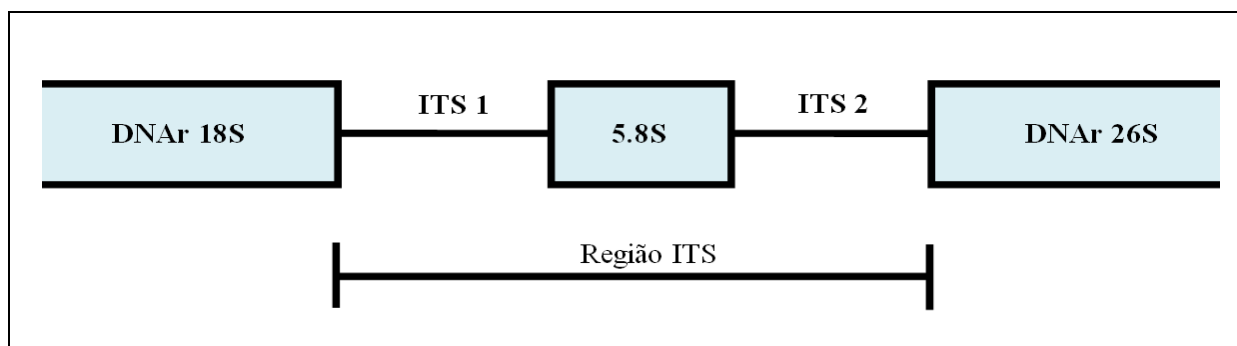


Figura 3. Região do DNAr e os espaçadores internos transcritos.

Os espaçadores internos transcritos evoluem rapidamente, sendo adequados para inferências filogenéticas e estudos evolutivos, uma vez que as substituições de regiões espaçadoras são mutações neutras sem quaisquer restrições fortes e geralmente não mostram quaisquer efeitos letais para os organismos, resultando numa taxa evolutiva relativamente rápida das regiões espaçadoras (Pamidimarri *et al.*, 2009).

As regiões de ITS apresentam elevados níveis de polimorfismo e são de fácil amplificação devido ao elevado número de cópias (Sharma *et al.*, 2002). Suas sequências divergem mais do que nas subunidades do DNA nuclear (18S, 5.8S e 26S) e são suficientemente variáveis para permitir a reconstrução filogenética (Baldwin *et al.*, 1995). Além disso, são sequências relativamente fáceis de alinhar, por possuírem pouca variação no comprimento, além de serem longas o suficiente para oferecer um número de caracteres satisfatório para reconstrução filogenética, sendo flanqueadas por regiões altamente conservadas dentro dos gêneros (Bechara *et al.*, 2010).

O destaque de dados de sequência desta fonte de DNA nuclear é ressaltado por um levantamento de publicações filogenéticas envolvendo comparações em nível de gênero ou

abaixo, que revela que dos 244 artigos publicados entre 1998 e 2002, 66% incluíram seus dados de sequência. Talvez ainda mais surpreendente seja o fato de que 34% de todas as hipóteses filogenéticas publicadas no citado período foram baseadas exclusivamente em suas sequências (Alvarez e Wendel, 2003). Ainda segundo os mesmos autores, a ampla utilização reportada na literatura para essas regiões dá-se, sobretudo, devido à simplicidade na amplificação; à universalidade dos primers e à variabilidade intergenômica, uma vez que a variabilidade das sequências é suficiente para resolver relações genéricas e infragenéricas. Finalmente, o uso de regiões ITS pode corroborar dados anteriormente publicados, solucionar conflitos relativos a outros dados ou ainda melhorar a compreensão das relações de espécies.

Alguns relatos indicam que a variação entre as sequências de ITS é principalmente atribuível a mutações pontuais. Uma proporção relativamente pequena de sítios é afetada por inserções ou deleções (*indels*) entre sequências que são semelhantes o suficiente para serem utilizadas em análise filogenética. Dentro desses limites, o alinhamento de sequências é geralmente inequívoco (Baldwin *et al.*, 1995).

5. Métodos de análise de dados moleculares

No início da década de 90, com o avanço das técnicas em biologia molecular, tanto no que diz respeito ao desenvolvimento de marcadores moleculares, quanto à aplicação do sequenciamento de DNA em análises genéticas, houve um aumento na produção de dados moleculares, os quais precisavam de ferramentas para seu processamento. Assim, a partir de esforços multidisciplinares foram desenvolvidos softwares que atendessem às necessidades dos pesquisadores (Prosdocimi *et al.*, 2002).

Quando se pretende inferir dados acerca da história evolutiva de um determinado táxon, frequentemente podem ser utilizados dois tipos principais de inferências moleculares: (1) fenéticas e (2) cladísticas ou filogenéticas, podendo-se optar por uma ou ainda, dependendo da estrutura dos dados, por ambas (Arriel *et al.*, 2009).

5.1. Análises fenéticas

Nas análises fenéticas, são empregadas medidas de distância ou de similaridade genética, que consolidam estatisticamente as diferenças entre os caracteres em um número.

Uma matriz de distância entre todos os possíveis pares do grupo de estudo é criada e árvores são desenvolvidas, agrupando táxons com menor diferença em um fenograma (Avice, 1994). Um dos métodos de distância mais comuns é a chamada distância p , que expressa o número de sítios variáveis entre duas sequências com relação ao total de sítios comparados (Mount, 2001).

Adicionalmente, existem outros modelos evolutivos utilizados para o cálculo de distâncias genéticas, como o Jukes-Cantor, Kimura 2-parâmetros, Tajima e Nei e Tamura 3-parâmetros. Na reconstrução filogenética, os algoritmos mais utilizados são o UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Means* - Método não polarizado de Agrupamentos aos Pares com Médias Aritméticas) e o *neighbor-joining* (NJ), que realizam uma série de cálculos com a matriz de distância gerada a partir do alinhamento (Prosdocimi *et al.*, 2002).

Na análise fenética, o algoritmo UPGMA considera que os táxons são igualmente distantes da raiz (ultramétrica). O algoritmo agrupa um par de táxons com a menor distância e recalcula a matriz assumindo este par como um táxon composto. Em seguida com base na nova matriz de dados, a célula com menor distância é incluída na árvore, e, assim, sucessivamente, até que todos os táxons estejam agrupados na árvore final (Mount, 2001).

O *neighbor-joining* é um método simples de evolução mínima o qual se baseia no cálculo das distâncias evolutivas para todos os indivíduos, levando à reconstrução de uma árvore que leva em consideração a relação entre todas as distâncias. No caso do NJ, a metodologia não busca examinar todas as possíveis topologias, mas aquelas que produzem uma árvore refletindo a organização sequencial de vizinhos que possam minimizar seu comprimento total (Schneider, 2007).

5.2. Análises filogenéticas

Nas análises filogenéticas são calculadas árvores para cada caráter, selecionando-se aquela que requer o menor número de mudanças (Máxima Parcimônia) ou aquelas mais prováveis estatisticamente (Máxima Verossimilhança e Análise Bayesiana). As análises filogenéticas são baseadas na premissa de que os membros do mesmo grupo evoluem a partir de um ancestral comum (Amorim, 2002).

O método de Máxima Parcimônia (MP) baseia-se no princípio de que a melhor hipótese para explicar um processo é aquela que requer o menor número de passos. Isto significa que a árvore que possuir um menor número de mudanças (substituições) para

explicar os dados do alinhamento é a mais próxima da real. Como, frequentemente as análises utilizando esses métodos geram mais de uma árvore, na maioria das vezes são utilizadas árvores consenso, pois estas compilam o grau de concordância entre as árvores obtidas na análise (Nei *et al.*, 1998).

O método de Máxima Verossimilhança (MV) baseia-se na reconstrução filogenética que avalia a hipótese sobre a história evolutiva em termos de probabilidade de que o modelo proposto e a história hipotética dariam origem ao conjunto de dados observados. A suposição é que a história com maior probabilidade de atingir o estado observado é preferida à história com mais baixa probabilidade. O método procura pela árvore com maior probabilidade ou mais verossímil (Buso, 2005).

A inferência Bayesiana consiste em obter uma distribuição da probabilidade, associada aos diferentes valores que o parâmetro de interesse pode assumir, de modo a representar o grau de credibilidade associado a cada um deles, a partir do conjunto de dados observados (Alfaro e Huelsenbeck, 2006). O ponto de partida é uma distribuição de probabilidade, dita a priori, obtida de considerações anteriores à observação dos genótipos. Esta distribuição de probabilidade pode então ser atualizada pela utilização do teorema de Bayes (Yang *et al.*, 1995).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albuquerque FA *et al.* (2009) Análise de crescimento inicial do *Jatropha curcas* em condições de sequeiro. **Oleaginosas e Fibrosas**, 13(3): 99–106.
- Alfaro ME and Huelsenbeck JP (2006) Comparative performance of Bayesian and AIC-based measures of phylogenetic model uncertainty. **Systematic Biology** 55: 89–96.
- Alvarez I and Wendel JF (2003) Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 29: 417–434
- Amorim DS (2002) **Fundamentos de sistemática filogenética**. Editora Holos, Ribeirão Preto, 136 pp.
- Argollo DM *et al.* (2013) Breeding and Biotechnology of *Jatropha curcas*. In: Bahadur I *et al* (eds). *Jatropha*, Challenges for a New Energy Crop. Volume 2: Genetic Improvement and Biotechnology.
- Arif AI *et al.* (2010) A Brief Review of Molecular Techniques to Assess Plant Diversity. **International Journal of Molecular Sciences** 11: 2079–2096.
- Arriel NHC *et al.* (2009) Outras aplicações dos marcadores moleculares. In: Borém A e Caixeta T (eds) *Marcadores moleculares*. Segunda Edição. Editora UFV, Viçosa, pp 209–274.
- Arruda FP *et al.* (2004) Cultivo de pinhão-mansão (*Jatropha curcas* L.) como alternativa para o semi-árido nordestino. **Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibrosas** 8: 789–799.
- Avisé JC (1994) **Molecular markers, natural history and evolution**. Chapman & Hall, New York, 511 pp.
- Baldwin BG *et al.* (1995) The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. **Annals of the Missouri Botanical Garden** 82: 247–277.
- Barbosa M *et al.* (1996) Checklist preliminar das Angiospermas. In: Sampaio E (eds) **Pesquisa botânica nordestina: progressos e perspectivas**. Editora SBB, Recife, pp 253–414.
- Barroso GM *et al.* (1991) **Sistemática de angiospermas do Brasil**. v.1, Universidade de São Paulo, São Paulo, 255 pp.
- Basha SD and Sujatha M (2007) Inter and intra-population variability of *Jatropha curcas* (L.) characterized by RAPD and ISSR markers and development of population-specific SCAR markers. **Euphytica** 156: 375–386.
- Basha SD and Sujatha M (2009) Genetic analysis of *Jatropha* species and interspecific hybrids of *Jatropha curcas* using nuclear and organelle specific markers. **Euphytica** 168: 197–214.
- Basha SD *et al.* (2009) A comparative study of biochemical traits and molecular markers for assessment of genetic relationships between *Jatropha curcas* L. germplasm from different countries. **Plant Science** 176: 812–823.
- Bechara MD *et al.* (2010) Phylogenetic relationships in genus *Arachis* based on ITS and 5.8S rDNA sequences. **BMC Plant Biology** 10: 255.
- Berchmans HJ and Kirata S (2008) Biodiesel production from crude *Jatropha curcas* L. seed oil with a high content of free fatty acids. **Bioresource Technology** 99: 1716–1721
- Berry PE *et al.* (2005) Molecular phylogenetics of the giant genus *Croton* and tribe Crotonae (Euphorbiaceae sensu stricto) using its and trnL-trnF DNA sequence data. **American Journal of Botany** 92(9): 1520–1534.
- Bhaskarwar *et al.* (2008) Evaluation of antimicrobial activity of medicinal plant *Jatropha podagrica* (Hook) **Roumanian Biotechnological Letters** 13 (5): 3873–3877.

- Bodo Slotta TA and Porter DM Genetic variation within and between *Iliamna corei* and *I. remota* (Malvaceae): implications for species delimitation. **Botanical Journal of the Linnean Society** 151: 345–354
- Buso GSC (2005) Marcadores Moleculares e Análise Filogenética. Documentos 137, EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia 22 pp
- Caetano-Anollés, G *et al.* (1991) DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. **Biotechnology**, 9: 553–556
- Carels N (2009) *Jatropha curcas*: a review (Chapter 2). In: Kader JC and Delseny M (Eds.) Advances in Botanical Research. **Academic Press**, pp. 39–86.
- Caruzo MBR (2010) Sistemática de *Croton* sect. Cleodora (Euphorbiaceae s. s.). Tese de Doutorado Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Botânica, 273 pp.
- Carvalho CR *et al.* (2008) Genome size, base composition and karyotype of *Jatropha curcas* L., an important biofuel plant. **Plant Science** 174: 613–617
- Cordeiro I and Carneiro-Torres DS (2006) Euphorbiaceae. In: Barbosa MRV *et al.* (eds) Checklist das plantas do Nordeste brasileiro v.1: Angiospermas e Gymnospermas. Ministério da Ciência e Tecnologia, Brasília, pp 71–74.
- Correa AMP (1984) Dicionário das plantas úteis no Brasil e das exóticas cultivadas. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal
- Dahmer N *et al.* (2009) Chromosome numbers of *Jatropha curcas* L.: an important agrofuel plant. **Crop Breeding and Applied Biotechnology** 9: 386–389.
- Davis CC *et al.* (2005) Explosive radiation of Malpighiales supports a mid-cretaceous origin of modern tropical rain forests. **The American Naturalist** 165(3): 36–65.
- Dehgan B and Craig ME (1978) Types of laticifers and crystals in *Jatropha* and their taxonomic implications. **American Journal of Botany** 65(3): 345–352.
- Dehgan B, Webster GL (1979) Morphology and infrageneric relationships of the genus *Jatropha* (Euphorbiaceae), v.74, University of California Publications in Botany, 1–73pp.
- Dehgan B (1980) Application of epidermal morphology to taxonomic delimitations in the genus *Jatropha* L. (Euphorbiaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society** 80: 257–78.
- Dehgan B (1984) Phylogenetic significance of interspecific hybridization in *Jatropha* (Euphorbiaceae). **Systematic Botany** 9: 467–478.
- Dehgan B and Schutzman B (1994) Contributions toward a monograph of neotropical *Jatropha*: phenetic and phylogenetic analyses. **Annals of the Missouri Botanical Garden** 81: 349–367.
- Erdtman G (1952) Pollen morphology and plant taxonomy – Angiosperms. Almqvist & Wiksell, Stockholm, 539 pp.
- Feliu DA (2011) Análise de terpenóides de espécies de *Croton* sect. Lamprocroton (Mull. Arg.) Pax. (Euphorbiaceae). Dissertação (Mestrado em Pós-graduação em Botânica) - Instituto de Biociências – USP.
- Fröhlich JK *et al.* (2010) Compostos isolados de *Jatropha isabelli* (Müell Arg.) com atividade gastroprotetora. **Saúde** 36 (2): 19–28.
- Grativol C *et al.* (2011) High efficiency and reliability of inter-simple sequence repeats (ISSR) markers for evaluation of genetic diversity in Brazilian cultivated *Jatropha curcas* L. **Molecular Biology Reports** 38: 4245–4256.
- Gupta S *et al.* (2008) Analogy of ISSR and RAPD markers for comparative analysis of genetic diversity among different *Jatropha curcas* genotypes. **African Journal of Biotechnology** 7(23): 4230–4243.

- He W *et al.* (2007). ISSR Analysis of Genetic Diversity of *Jatropha curcas* L. Chin. J. Appl. Environ. Biol. 13: 466–470.
- Heller J (1996) Physic nut – *Jatropha curcas* L. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. International Plant Genetic Resources Institute, Gatersleben, 66 pp.
- Kumar A and Sharma S (2008) An evaluation of multipurpose oil seed crop for industrial uses (*Jatropha curcas* L.): a review. Ind Crop Prod 28: 1–10
- Kumar RS *et al.* (2009) Molecular characterization of *Jatropha* genetic resources through inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. **Molecular Biology Reports** 36: 1951–1956.
- Leal CKA and Agra MF (2005) Estudo Farmacobotânico Comparativo das folhas de *Jatropha molissima* (Pohl) Baill. e *Jatropha ribifolia* (Pohl) Baill. (Euphorbiaceae). **Acta Farmaceutica Bonaerense** 24(1): 5–13.
- Lima LR and Pirani JR (2008) Revisão taxonômica de *Croton* sect. Lamprocroton (Müll. Arg.) Pax (Euphorbiaceae s.s.). **Biota Neotropica** 8(2): 177–231.
- Lorenzi H and Matos FJA (2008) **Plantas Medicinais no Brasil Nativas e Exóticas**. São Paulo: Instituto Plantarum 2: 48–249.
- Luís RMFCB (2009) **Respostas de *Jatropha curcas* L. ao déficit hídrico**: Caracterização bioquímica e ecofisiológica. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrônoma) - Instituto Superior de Agronomia. Universidade Técnica de Lisboa. Lisboa, 62p
- Marques DA and Ferrari RA (2008) O papel das novas biotecnologias no melhoramento genético do pinhão-mansão. **Biológico** 70(2): 65–67.
- Martin G and Mayeux A (1984) Réflexions sur les cultures oléagineuses énergétiques. II. – Le Pourghère (*Jatropha curcas* L.): un carburant possible. **Oléagineux** 39(5): 283–287.
- Mount DW (2001) **Bioinformatics: Sequence and Genome Analysis**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 564 pp.
- Nei M *et al.* (1998) The optimization principle in phylogenetic analysis tends to give incorrect topologies when the number of nucleotides or amino acids used is small. Proceedings of National Academy of Sciences (USA) 95: 12390–12397.
- Núñez-Colín CA, Goytia-Jiménez MA (2009) Distribution and agroclimatic characterization of potential cultivation regions of physic nut in Mexico. Pesquisa Agropecuária Brasileira 44(9): 1078–1085.
- Pamidimarri DVNS *et al.* (2009) Comparative study of interspecific genetic divergence and phylogenetic analysis of genus *Jatropha* by RAPD and AFLP. **Molecular Biology Reports** 36: 901–907.
- Pamidimarri DVNS *et al.* (2010) Molecular characterization and genetic diversity analysis of *Jatropha curcas* L. in India using RAPD and AFLP analysis. **Molecular Biology Reports** 37: 2249–2257.
- Peixoto AR (1973) **Plantas oleaginosas arbóreas**. Editora Nobel, São Paulo, 284 pp.
- Prosdociimi F *et al.* (2002) Bioinformática: manual do usuário. Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento. Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento 29: 12–25.
- Ram SG *et al.* (2008) Genetic diversity among *Jatropha* species as revealed by RAPD markers. **Genetic Resources and Crop Evolution** 55: 803–809.
- Ranade AS *et al.* (2008) Easy assessment of diversity in *Jatropha curcas* L. plants using two single-primer amplification reaction (SPAR) methods, **Biomass Bioenergy** 32: 533–540.
- Sátiro LN and Roque N (2008) A família Euphorbiaceae nas caatingas arenosas do médio rio São Francisco, BA, Brasil. **Acta Botanica Brasilica** 22 (1): 99–118.

- Schneider H (2007) **Métodos de Análise Filogenética: Um guia prático**. Editora Holos, Ribeirão Preto, 200 pp.
- Schutz J and Wolf M (2009) ITS2 sequence-structure analysis in phylogenetics: a how-to manual for molecular systematics. **Molecular and Pylogenetic Evolution** 52: 520–523
- Secco RS (1990) Padrões de distribuição geográfica e relações taxonômicas de algumas Crotonoideae (Euphorbiaceae) da Amazônia. **Acta Botanica Brasilica** 4: 91–103.
- Sharma Set *al.* (2002) Internal transcribed spacer (ITS) sequences of ribosomal DNA of wild barley and their comparison with ITS sequences in common wheat. *Barley Genetics Newsletter* 32: 38–45.
- Shen, J. *et al.* (2012) AFLP-based molecular characterization of 63 populations of *Jatropha curcas* L. grown in provenance trials in China and Vietnam. **Biomass and Bioenergy** 37: 265–274.
- Silva SI (1998) **Euphorbiaceae da caatinga**: distribuição das espécies e potencial oleaginoso. Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. São Paulo, 132p.
- Souza VC and Lorenzi H (2008) **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG I**. 2. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 704 p.
- Soontornchainaksaeng P and Jenjittikul T (2003) Karyology of *Jatropha* (Euphorbiaceae) in Thailand. *Thai Forest Bulletin (Botany)* 31: 105–112.
- Sujatha M, Dhingra M (1993) Rapid plant regeneration from various explants of *Jatropha integerrima*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 35: 293–296
- Sujatha M *et al.* (2008) Role of biotechnological interventions in the improvement of castor (*Ricinus communis* L.) and *Jatropha curcas* L. **Biotechnology Advances** 26: 424–435.
- Sun QB *et al.* (2008) SSR and AFLP Markers Reveal Low Genetic Diversity in the Biofuel Plant *Jatropha curcas* in China. **Crop Science** 48: 1865–1871.
- Tanya P *et al.* (2011) Genetic Diversity Among *Jatropha* and *Jatropha*-Related Species Based on ISSR Markers. **Plant Molecular Biology Reporter** 29: 252–264.
- Tatikonda L *et al.* (2009) AFLP-based molecular characterization of an elite germplasm collection of *Jatropha curcas* L., a biofuel plant. **Plant Science**. 176: 505–513
- Vale JR *et al.* (2006) Estudo comparativo da cicatrização de gastrorrafias com e sem o uso do extrato de *Jatropha gossypifolia* L. (pinhão-roxo) em ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira** 2: 40–48.
- Webster GLA (1987) The saga of the spurges: a review of classification and relationships in the Euphorbiales. **Botanical Journal of the Linnean Society** 94: 3–46.
- Webster GLA (1994a) Classification of the Euphorbiaceae. **Annals of the Missouri Botanical Garden** 81: 3–32.
- Webster GLA (1994b) Synopsis of the genera and suprageneric taxa of Euphorbiaceae. **Annals of the Missouri Botanical Garden** 81: 33–144.
- Wurdack KJ *et al.* (2005) Molecular phylogenetic analysis of uniovulate Euphorbiaceae (Euphorbiaceae sensu stricto) using plastid *rbcL* and *trnL-F* DNA sequences. **American Journal of Botany** 92(8): 1397–1420.
- Yang Z *et al.* (1995) A new method of inference of ancestral nucleotide and amino acid sequences. **Genetics** 141: 1641–1650.

Capítulo 1

Artigo intitulado

MARKER DEVELOPMENT AND INSIGHT ON THE GENETIC VARIABILITY OF *Jatropha curcas* ACCESSIONS FROM BRAZILIAN GERMPLASM¹

Felix, A. M. S. *et al.* (em preparação)

¹A ser submetido à revista

Caatinga

(ISSN 0100-316X, Qualis B5)

Marker development and insight on the genetic variability of *Jatropha curcas* accessions from Brazilian germplasm

Ana M. S. Felix¹, Lidianie L. B. Amorim¹, Valesca Pandolfi¹, João Pacífico Bezerra Neto¹, Santelmo S. Vasconcelos¹, Nair H. C. Arriel², Daniela A. Marques³, Ana C. Brasileiro-Vidal¹, Ana M. Benko-Iseppon^{1*}

¹Universidade Federal de Pernambuco, Center of Biological Sciences, Genetics Department, Av. Prof. Moraes Rêgo 1235, CEP 50.670-420, Recife, PE, Brazil.

²Embrapa Algodão, R. Osvaldo Cruz 1143, CEP 58428-095, Campina Grande, PB, Brazil

³Instituto Agronômico de Campinas (IAC), Centro de Recursos Genéticos Vegetais, Avenida Theodureto de Almeida Camargo, 1500, 13075-630, Campinas, SP, Brazil

*Corresponding author.

ABSTRACT

Efficient sampling and implementation of germplasm resources require an accurate identification of plant material. *Jatropha curcas* L. is known as a non edible oil crop with increased importance for the production of biodiesel. The present work characterized 12 accessions of physic nut as compared with some related species using molecular markers (ISSR, Inter Simple Sequence Repeat and DAF, DNA Amplification Fingerprinting) data. Besides, the informativeness of ITS-1 sequencing on physic nut diversity was also evaluated using many accessions, as compared with related species from *Jatropha* and other genera. Two ISSR markers (UBC 808, UBC 809) tested were significantly informative (polymorphism level 78%), while the two DAF markers (OPL07, OPL11) tested showed 44% polymorphism. ITS regions were partially amplified for 10 physic nut accessions revealing scarce polymorphism levels within physic nut, besides moderate interspecific polymorphism considering other *Jatropha* species, indicating that these markers are useful only for interspecific or suprageneric comparisons. The developed markers may be tested in a larger sample and may possibly regard additional sources for further evaluation of the genetic variability within physic nut accessions deposited in germplasm banks.

Keywords: Physic nut. Molecular markers.DAF.ISSR.ITS.Polymorphism.Genetic variability

INTRODUCTION

The genus *Jatropha* (Euphorbiaceae family) includes about 175 species mainly distributed in tropical and subtropical areas (SUJATHA *et al.*, 2008), having potential for exploitation in the context of medicine, nutrition, agriculture, pharmacology, ornamentation and chemistry, in addition to its uses in the vegetable oil industry (LEAL; AGRA, 2005). Currently the potential use of certain *Jatropha* species for biodiesel production has been considered, in order to generate economic, social, and environmental benefits. For this purpose the species *J. curcas* L., popularly known as physic nut, stands out by gathering outstanding features such as planting perennial hardiness, ease of adaptation to different environmental conditions and mainly due to its high seed oil content (SATURNINO *et al.*, 2005).

Despite the significant socioeconomic importance attributed to physic nut, Saturnino *et al.* (2005) argued that systematic research on this culture started only in the last three decades. Thus, in order to achieve greater genetic variability, recent research was carried out at Embrapa Cotton (Campina Grande, PB) aiming the formation of an Active Germplasm Bank (AGB), composed by materials from different regions of origin, demanding molecular studies in order to characterize the available germplasm diversity. According to Basha *et al.* (2009) molecular studies are still scarce in regard to genetic variation of different *J. curcas* accessions and related species. However, this is a critical step for breeding programs, by facilitating the conservation and utilization of genetic resources, allowing the identification of unique genotypes and sources of diversity among available germplasm (RAM *et al.*, 2008).

Strategies for assessing the genetic variability and the relationship between different species, populations and accessions are complemented by molecular techniques with considerable success (WINTER; KAHL, 1995). For this purpose, some molecular techniques based on PCR (Polymerase Chain Reaction) are available. Among these, DAF (DNA Amplification Fingerprinting) and ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) deserve mentioning (FALEIRO, 2007). DAF stands out by its simplicity for genetic analysis, since it does not use radioactivity, requires a small amount of DNA and avoids the need of previous knowledge about the genome of the studied species (BENKO-ISEPPON *et al.*, 2003). In turn, ISSR are often used in analysis of genetic diversity, because they are reproducible, generate a large number of informative bands, being abundant throughout the genome of eukaryotes, evolving rapidly also due to their simple, fast and reproducible character (PRADEEP REDDY *et al.*, 2002).

The ITS (Internal Transcribed Spacer) region is located between the 18S and 26S rDNA genes and can be amplified by specific primers, whereas the first spacer (ITS-1) has been considered the most informative, being appropriated for population analysis as well as

evolutionary studies among species (HILLIS; DIXON, 1991). These regions exhibit intraspecific length conservation and high variability of nucleotides. Furthermore, the gene family in which the ITS region falls presents a repetitive pattern, being distributed throughout the plant nuclear genome, with easy fragment detection and sequencing (HILLS; DIXON, 1991; BALDWIN *et al.*, 1995).

The present study aimed to develop informative DAF and ISSR markers for the characterization of *J. curcas* accessions and related species, also testing the sensitivity of ITS-1 genomic sequences to access genetic variability at the intra and interspecific levels within physic nut as compared to related species, allowing an insight on the potential of different marker types to infer on the *J. curcas* diversity.

MATERIAL AND METHODS

Samples evaluated, their provenances and methods applied are listed in Table 1. Before extraction, leaf tissue samples were collected at the Germplasm Banks (Embrapa Cotton or IAC) or at their native sites using CTAB preservation buffer, as described by Rogstad (1992). Afterwards, we proceeded to a maxi-prep DNA extraction procedure according to Weising *et al.* (1995), with minor modifications. The DNA quantification was performed using a spectrophotometer and by the comparative agarose gel method at the concentration of 1.2% using different λ -DNA as reference. Additionally, the DNA samples were quantified by spectrophotometer. Aiming to purify the DNA samples, all probes were subjected to selective polysaccharide precipitation as described by Michaels *et al.* (1994), and also to RNase treatment (10 mg/mL) with incubation for 2 h at 37°C.

DAF reactions were carried out as described by Benko-Iseppon *et al.* (2003), using 0.1-1 ng of genomic DNA, 1.5 μ L of 10 $\times$ buffer, 50 mM MgCl₂, 2.5 mM of dNTP mix, 5 to 20 pmol primer and 0.4 U of Taq polymerase (Fermentas), with adjustment of the final volume to 15 μ L with sterile Milli-Q H₂O. The amplification reaction was performed in an Eppendorf Thermal Cycler with 2 min initial denaturation at 95°C, followed by 40 cycles composed by three steps: denaturation 15 s 95°C, 1 min annealing at 35°C and elongation for 2 min; at 72°C. At the end of the 40 cycles the reaction was completed with a final extension of 2 min at 72°C.

In turn, ISSR amplifications were carried out in 20 μ L reactions containing 25 ng of genomic DNA, 1 $\times$ reaction buffer, 2.5 mM MgCl₂, 200 μ M of each dNTP, 50 pmol primer and 0.7 U Taq DNA polymerase (Fermentas). For each primer, a gradient PCR ranging from 45 °C to 65 °C was used to determine the optimum annealing temperature. The PCR cycling conditions were as follows: denaturation at 94 °C for 4 min and 35 cycles of 30 s at 94 °C, 45 s with varied temperatures as per the melting temperature of the ISSR primers used, 2 min at 72

°C and 7 min final extension step at 72 °C. The amplification products generated from the reactions using DAF and ISSR reaction products were subjected to electrophoresis on 1.8% agarose gel in TBE (Tris base, boric acid, EDTA) and stained with ethidium bromide at 0.5 mg/mL, being subsequently photographed under ultraviolet light. Fragment sizes were estimated by comparison with a 100 bp ladder used as molecular weight standard.

Table 1. Accessions of *Jatropha curcas* and related species studied in the present work with their respective accession number and name or provenance and type of markers tested (DAF, DNA Amplification Fingerprinting; ISSR, Inter Simple Sequence Repeat and ITS-1, Internal Transcribed Spacer-1).

Ord	Species	Accession	Provenance	DAF	ISSR	ITS-1
1.	<i>J. curcas</i>	I, Sumé (Estacas) = J16←	Embrapa Cotton Germplasm	X	X	
2.	<i>J. curcas</i>	II, Colombia =J17	Embrapa Cotton Germplasm	X	X	
3.	<i>J. curcas</i>	III, Petrolina= J18	Embrapa Cotton Germplasm	X	X	
4.	<i>J. curcas</i>	IV, Tocantinópolis =J19, Plant 2	Embrapa Cotton Germplasm	X	X	
5.	<i>J. curcas</i>	V, Petrolina = J20, Plant 2←	Embrapa Cotton Germplasm	X	X	
6.	<i>J. curcas</i>	VI, Oliveira de Fátima = J21, Plant 1	Embrapa Cotton Germplasm	X	X	
7.	<i>J. curcas</i>	VII, El Salvador = J22, Plant 2	Embrapa Cotton Germplasm	X	X	
8.	<i>J. curcas</i>	VIII, Estacas = J23, Plant 1	Embrapa Cotton Germplasm	X	X	
9.	<i>J. curcas</i>	IX, ; = J24, Plant 1←	Embrapa Cotton Germplasm	X	X	
10.	<i>J. curcas</i>	X, Marisnópolis = J25, Plant 1	Embrapa Cotton Germplasm	X	X	
11.	<i>J. curcas</i>	XI, África = J26, Plant 2	Embrapa Cotton Germplasm	X	X	
12.	<i>J. curcas</i>	XII, Sementes = J27, Plant 2	Embrapa Cotton Germplasm	X	X	
13.	<i>J. curcas</i>	XIII, Perú = J28, Plant 2←	Embrapa Cotton Germplasm	X	X	
14.	<i>J. curcas</i>	XIV, Mundo Novo = J29, Plant 2	Embrapa Cotton Germplasm	X	X	
15.	<i>J. curcas</i>	XV, São Miguel do Araguaia = J30, Plant 1	Embrapa Cotton Germplasm	X	X	
16.	<i>J. curcas</i>	XVI, Garanhuns = J31, Plant 1	Embrapa Cotton Germplasm	X	X	
17.	<i>J. curcas</i>	XVII, Patos-PB = J32, Plant 5	Embrapa Cotton Germplasm	X	X	
18.	<i>J. curcas</i>	A6 – L3P27 (J85)	IAC Germplasm			X
19.	<i>J. curcas</i>	A5 – L4P19 (J86)	IAC Germplasm			X
20.	<i>J. curcas</i>	A1 – L6P7 (J88)	IAC Germplasm			X
21.	<i>J. curcas</i>	A6 – L1P7 (J89)	IAC Germplasm			X
22.	<i>J. curcas</i>	A1 – L10P5 (J90)	IAC Germplasm			X
23.	<i>J. curcas</i>	A5 – L8P29 (J91)	IAC Germplasm			X
24.	<i>J. curcas</i>	Mex – Q153/A4 (J92)	IAC Germplasm			X
25.	<i>J. curcas</i>	A16 - L12P19 (J124)	IAC Germplasm			X
26.	<i>J. curcas</i>	A6 - L2P19 (J125)	IAC Germplasm			X
27.	<i>J. curcas</i>	A3 - L12P4 (J127)	IAC Germplasm			X
28.	<i>J. gossypifolia</i>	1607 (J15), Sirinhaém, PE ←	Benko-Iseppon, A.M.	X	X	X
29.	<i>J. gossypifolia</i>	J34, Lagoa Seca, PB	Embrapa Cotton Germplasm	X	X	
30.	<i>J. molissima</i>	J13, no number, Serra Talhada, PE ←	Cultivated in glasshouse, UFPE	X	X	X
31.	<i>J. molissima</i>	J33, Lagoa Seca, PB	Embrapa Cotton Germplasm	X	X	
32.	<i>J. curcas</i>	AM774639**	Downloaded from GenBank			X
33.	<i>J. glandulifera</i>	EU881727**	Downloaded from GenBank			X
34.	<i>J. gossypifolia</i>	EU340792**	Downloaded from GenBank			X
35.	<i>C. xalapensis</i>	EU477988**	Downloaded from GenBank			X
36.	<i>C. yecorensis</i>	AY971258**	Downloaded from GenBank			X
37.	<i>C. ynesae</i>	FJ614706**	Downloaded from GenBank			X

The six accessions evaluated in the selection phase are indicated by “←”, whereas GenBank accessions downloaded from NCBI (National Center of Biotechnology Information) for comparison with own ITS-1 sequences are indicated by “**”. Plant name abbreviations: *J.* = *Jatropha*; *C.* = *Croton* (both Crotonoidae subfamily from Euphorbiaceae).

After photographic record and analysis of the gels, a binary data matrix was constructed, based on the visual criterion of presence (1) or absence (0) of the amplified fragments, being subsequently submitted to a neighbor joining analysis using the software Mega V.5 (TAMURA *et al.*, 2011) with regular parameters and 1,000 bootstrap pseudoreplications.

The discriminatory power of the primers was determined by three parameters: Polymorphism Information Content (PIC), calculated as provided by Roldán-Ruiz *et al.* (2000); Marker Index (MI) as proposed by Varshney *et al.* (2007) and Resolution Power (RP), obtained according to Prevost and Wilkinson (1999).

ITS-1 sequences were amplified by PCR using the primers ITS1 (5'-TCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTG-3') and ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') following the protocol described by Yano *et al.* (2004). For sequencing, the fragments were submitted to a sequencing reaction using the BigDye Terminator kit version 3.1 (Applied Biosystems) and the ABI-3130-xl automatic equipment (Applied Biosystems) according to manufacturers recommendations. The sequences were edited using the software BioEdit 7 (HALL, 2001), aiming at building consensus sequences, which were compared to those deposited in GenBank by BLASTn tool (ALTSCHUL *et al.* 1997) for identity confirmation. Multiple alignments were generated using the program ClustalW (THOMPSON *et al.*, 1994) with edition to eliminate not aligned extremities and non informative regions. Phenograms were constructed using the neighbor-joining method under the total gap removal and Kimura's two-parameter substitution model using the MEGA 5 software package (TAMURA *et al.*, 2011). The nodal support values were obtained from 1,000 bootstraps pseudoreplications.

RESULTS AND DISCUSSION

DNA yield and purity

The DNA samples extracted presented significant amounts, since there was no sign of degradation and the presence of RNA was low, when observed (Supplementary Figure S1). The spectrophotometer analysis revealed that the amount of DNA obtained was sufficient for use in PCR reactions, with values ranging between 84.1 and 392.9 ng/μL. Despite of the relatively large amount, many samples lacked purity and some did not amplify very well by PCR, even after polysaccharide precipitation and RNase treatment, indicating the presence of phenolic contaminants. Such problems have been also reported for other Euphorbiaceae, as for *Ricinus communis* L. for which some adapted protocols have been published (PUROHIT *et al.*, 2012). On the other hand, in the case of last species another study of our group (VASCONCELOS *et al.*, submitted) obtained DNA in large amounts and very good quality using the same protocol applied in the present approach.

DAF and ISSR markers generated

For marker development a first primer selection step was carried out including six *Jatropha* accessions (four *J. curcas*, one *J. gossypifolia* and one *J. molissima* indicated in Table 1) using 13 DAF primers (*Operon Technologies*, OP) and seven ISSR primers (*Universty of British Columbia*, UBC) randomly selected (Table 2). A data matrix was generated after this step, being submitted to a neighbor joining analysis. The resulting phenogram is presented in Figure 1, highlighting the position of all four *J. curcas* accessions together with a high bootstrap (100) whereas within this clade a higher association was evident between accessions J24 and J28 (bootstrap 94) and among them with J20 (bootstrap 92), while J16 was the most dissimilar from the four analyzed physic nut accessions. In this phenogram *J. gossypifolia* and *J. molissima* grouped in a basal position but no statistical support was given within this grouping and among it and the *J. curcas* group.

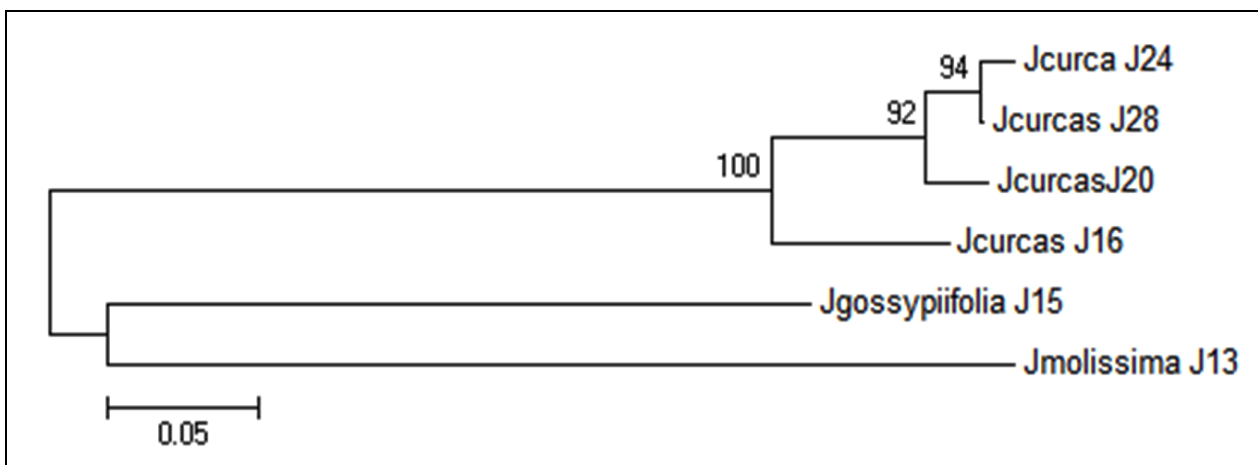


Figure 1. Phenogram generated by DAF and ISSR polymorphisms using four *Jatropha curcas* accessions, as compared with two related *Jatropha* species (*J. gossypifolia* and *J. molissima*). Numbers at the base of the branches regard bootstrap values. Scale bar represents 5% divergence.

After this stage, four primers (two DAF and two ISSR) were applied on 21 *Jatropha* accessions (Supplementary Figure S2), but only 15 (12 *J. curcas*, two of *J. molissima* e one of *J. gossypifolia*) presented scorable bands and enabled the generation of a phenogram (Figure 2).

The neighbor joining phenogram generated after submission of the data matrix based on ISSR and DAF bands of 12 *J. curcas* accessions from Embrapa Cotton Germplasm (Figure 2) revealed a restricted genetic diversity at the intraspecific level. This may be attributed to the fact that *J. curcas* is an introduced plant species in Brazil and comes from similar sources or, still, due to the low number of markers and accessions used, besides the fact that all accessions

came from a single germplasm bank (Embrapa Cotton), which were supplied by local producers. The phenogram constructed based on ISSR and DAF polymorphisms exhibited two main clusters. Cluster 1 contained 12 *J. curcas* accessions from Embrapa Cotton germplasm, whereas the second cluster was presented by two samples of related species (*J. gossypiifolia* and *J. molissima*), confirming its genetic distinctness from *J. curcas*. Current research shows that different types of molecular markers such as AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), SSR (Simple Sequence Repeat) and RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) also pointed to a general limited variation other accessible germplasm resources of *J. curcas* in various countries (SUN *et al.*, 2008; KUMAR *et al.*, 2009; SUBRAMANYAM *et al.*, 2009; ROSADO *et al.*, 2010).

Table 2. Primers used in the selection step (in six accessions), with their respective sequences, total number of generated bands, as well as polymorphisms on the intra- and interspecific levels. Primers are ordered according to their total number of polymorphism from the higher to the lower amounts. DAF (DNA Amplification Fingerprinting) primers used are ordered from 1 to 13, whereas ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) from 14 to 20.

Ord.	Name	Sequence 5' - 3'	# of bands	Polymorphisms		
				Intra-sp	Inter-sp	Total
1.	DAF-L08	AGCAGGTGGA	07	02	05	07
2.	DAF-M05	GGGAACGTGT	07	01	04	05
3.	DAF-L07*	AGGCGGGAAC	07	00	03	03
4.	DAF-L10	TGGGAGATGG	05	00	03	03
5.	DAF-L11*	ACGATGAGCC	04	01	02	03
6.	DAF-M07	CCGTGACTCA	04	00	03	03
7.	DAF-L20	TGGTGGACCA	03	00	03	03
8.	DAF-L13	ACCGCCTGCT	04	00	02	02
9.	DAF-M13	GGTGGTCAAG	02	00	02	02
10.	DAF-K12	TGGCCCTCAC	03	01	00	01
11.	DAF-M01	GTTGGTGGCT	06	00	01	01
12.	DAF-M08	TCTGTTCCCC	02	00	01	01
13.	DAF-L09	TGCGAGAGTC	01	00	00	00
14.	ISSR-808*	(AG) ₈ C	09	02	05	07
15.	ISSR-809*	(AG) ₈ G	06	01	03	04
16.	ISSR-818	(CA) ₈ G	03	00	02	02
17.	ISSR-834	(AG) ₈ YT*	07	00	01	01
18.	ISSR-840	(GA) ₈ YT*	05	00	01	01
19.	ISSR-841	(GA) ₈ YC*	04	00	01	01
20.	ISSR-856	(AC) ₈ YA*	04	00	01	01

*In degenerate ISSR primers, Y means C or T.

The obtained results indicate that germplasm exchange among different countries may be necessary, even though a higher number of markers should be generated to assure this presumption. Besides scarce polymorphism at the interspecific level, a comparison with related species here analyzed (*J. gossypiifolia* and *J. molissima*) revealed some additional

polymorphisms, being reflected on the PIC, MI and RP values (Table 2). According to the frequency of the marker fragments present per access (fi), the DAF marker OPL07 showed low level of polymorphism (33%). In turn, the DAF marker OPL11 showed 66% polymorphism. The ISSR marker 808 showed 80% polymorphism and ISSR marker 809 showed 77% polymorphism (Table 2). In average ISSR markers were more informative (with 78% polymorphism) than DAF (in average only 44%), but this scenario could be changed if a more significant number of markers had been analyzed. Also the low polymorphism number may be attributed to the restricted number of primers tested in the selection phase, and to the very low number of primers (only four) applied in, since most studies use much larger number of selected primers and also larger number of accessions, what would increase the chances to find intraspecific polymorphism.

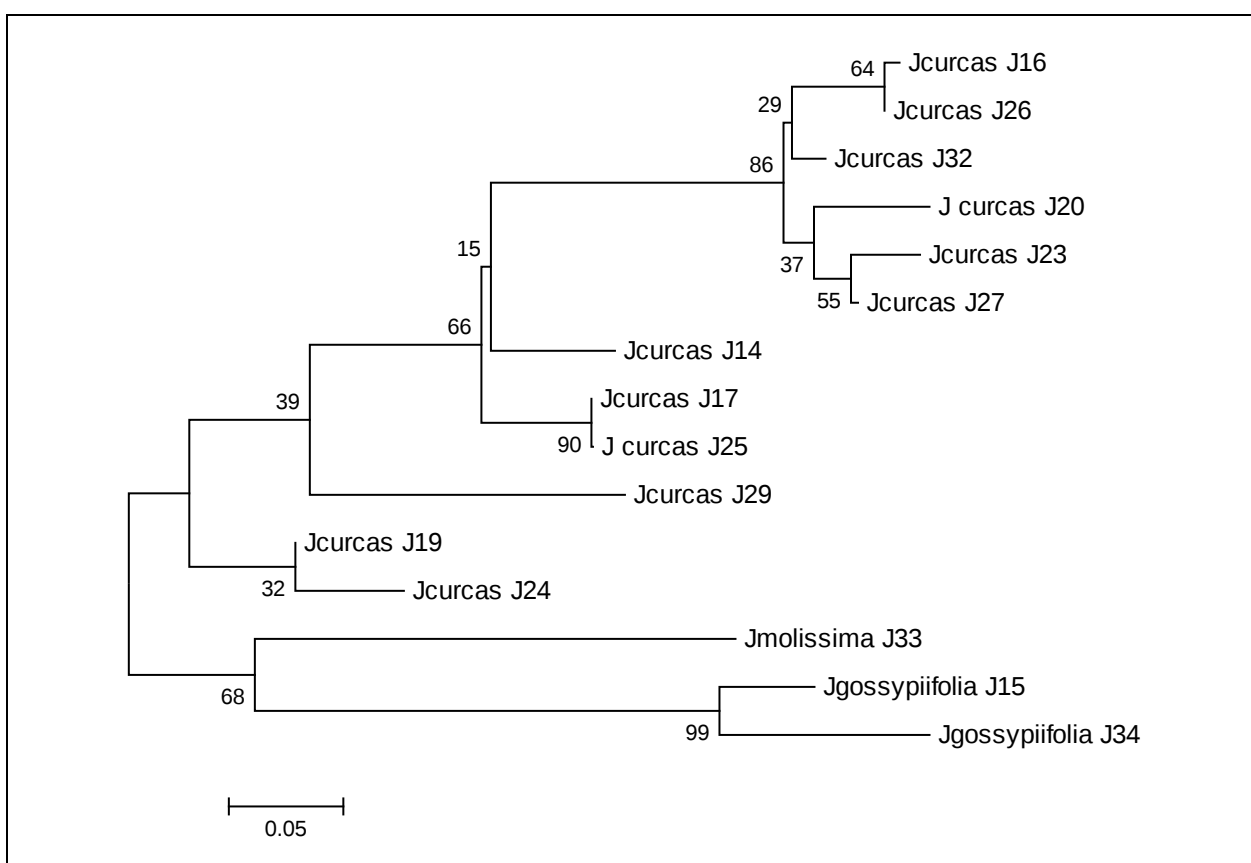


Figure 2. Phenogram generated by DAF and ISSR polymorphisms using 12 *Jatropha curcas* accessions, as compared with two related *Jatropha* species. Numbers at the base of the branches regard bootstrap values. Scale bar represents 5% divergence.

Tatikonda *et al.* (2009) reported that the efficiency of a marker depends on the ability to detect polymorphisms among a set of accessions. Thus, when analyzing 48 accessions of *J. curcas* using AFLP the authors identified a polymorphism average value of 88.2% indicating a

satisfactory polymorphism in the accessions studied. In turn, Sun *et al.* (2008) obtained low polymorphism (14%) among 56 physic nut accessions analyzed using AFLP and SSR markers.

PIC values obtained from the DAF markers OPL07 and OPL11 were 0.32 and 0.13, respectively, while for ISSR markers UBC808 and UBC809 the values were, respectively, 0.39 and 0.25 (Table 3). Ram *et al.* (2008) applied 26 RAPD primers to five *J. curcas* accessions and identified an average PIC value of 0.44. According to these authors the maximum PIC for dominant markers is 0.50, so the results obtained by the authors indicate high quality of the markers used, where as the here obtained PIC values presented moderate polymorphism content. Otherwise, considering that mainly the interspecific level was analyzed in the present work, these results are therefore not comparable.

The *fi* values obtained for all markers indicate a possible correlation with other indices analyzed, although the Pearson coefficient was not calculated in the present work due to the small number of markers evaluated (Table 3). However, Laurentin and Karlovsky (2007) argue that the lack of correlation between the PIC, MI and PR values observed in their study uncover that these rates do not always assess the informativeness of a primer. According to Prevost and Wilkinson (1999), the resolving power refers to the ability of a primer in differentiating the accessions analyzed. PR values obtained for primer OPL07 and OPL11 were 1.75 and 1.66, respectively. While for the ISSR primers UBC808 and UBC 809 values obtained were 3.75 and 3.14 respectively. Thus, the results shown from the calculation of the index indicate low PR to differentiate hits on all markers used.

Table 3. Primers applied to 17 physic nut accessions including total number of bands (TNB), number of monomorphic bands (NMB) and number of polymorphic bands (NPB), the polymorphism percentage (*fi*), as well as Polymorphism Information Content (PIC), Marker Index (MI) and Resolving Power (RP) of the primers used.

Primer	TNB	NMB	NPB	<i>fi</i> (%)	PIC	MI	RP
DAF-L07	3	1	2	66	0.32	0.97	1.75
DAF-L11	6	4	2	33	0.13	0.19	1.66
ISSR-808	5	1	4	80	0.39	2.22	3.75
ISSR-809	9	2	7	77	0.25	1.35	3.14
Total DAF	9	5	4	44	0.22	0.58	1.46
Total ISSR	14	3	11	78	0.32	1.78	3.45

Average MI values were 0.58 for DAF and 1.78 for ISSR. The average values of RP ranged from 1.46 for DAF to 3.45 for ISSR. The values of MI and RP obtained in this study were very low compared with literature data. For example, Laurentim and Karlovsky (2007) analyzing 20 sesame accessions from AFLP markers obtained MI average values ranging from

10.34 to 18.94 RP. The markers applied in our study showed moderate polymorphism, but probably due to the use of other species for comparison. Regarding the intraspecific level, the number of polymorphic bands was low, maybe due to the low number of accessions evaluated or still in consonance of the relatively narrow genetic basis of physic nut, as proposed by Marques and Ferrari (2008). This narrow basis has been attributed to low genetic variability identified the provenance of the material analyzed, since the majority of accessions were collected in relatively close geographic regions, or even the possible propagation, which reduces the genetic basis, as suggested by Sun *et al.* (2008).

There are few studies on molecular variability based on available germplasm for physic nut in Brazil, since the majority of studies have been related to breeding programs in other countries with emphasis on India and China. Some of these studies involving AFLP, ISSR and SSR markers, among others, also revealed low diversity among physic nut. Moreover, some literature data reported high polymorphism. This is the case, for example, of Yadav *et al.* (2011) that observed high levels of polymorphism between 25 accessions of *J. curcas* collected in eight states of India using microsatellite markers. However, these authors claim that the PIC values obtained indicated low to moderated levels of informativeness of the markers used, similar to the results presented in the present paper.

The use of pre-existing genetic intraspecific diversity is linked to the knowledge of the variability in germplasm banks, with an urgent need of molecular markers such as RAPD, AFLP, ISSR and SSR markers to assure the existence of diversity beyond phenotype (BASHA; SUJATHA, 2007). Therefore, it is emphasized that joint efforts are essential to the achievement of positive results in research involving physic nut, since it is still lacks breeding programs with modern biotechnological approaches (MARQUES; FERRARI, 2008). It is important to highlight the clear need to gather a maximum number of accesses from different regions and countries, to obtain the maximum yield of the available germplasm for breeding programs including *Jatropha* species, which present considerable potential for economic exploitation. So this is also a limitation of the present work, since only accessions from a single bank (Embrapa Cotton) were used for DAF/ISSR, as shown in Table 1.

ITS Sequencing

Attempts for ITS-1 sequencing were carried out for 38 accessions [Supplementary Table S1, all from IAC (Instituto Agronômico de Campinas) germplasm bank], but only 10 worked for multiple alignments so far and also these, with exclusion of significant informative

regions due to low quality or incomplete sequencing. The fragments sequenced ranged from 545 to 1020 bp (base pairs) in length, some of them exceeding the expected size, taking as reference previously sequenced ITS regions. However, we found that many presented low quality or still an addition of the complex ITS1-5.8S-ITS2, bearing sequences from adjacent regions (18S rDNA and 26S), which had to be removed before proceeding with the analysis. Bechara *et al.* (2010) states that the ITS regions are long enough to offer a number of possible characters for phylogenetic reconstruction and are flanked by highly conserved regions within the genera. Considering that, we probably have to search for more conserved regions aiming a more specific ITS-1 amplification in *J. curcas*.

Other authors mention that ITS regions evolve rapidly, with high levels of polymorphism and are easily amplified due to the large number of copies, becoming thus an important molecular approach to establish relationships among plant species as well as to infer the similarity intraspecific (BALDWIN *et al.*, 1995; SHARMA *et al.* 2002). To verify the interspecific diversity of *Jatropha*, we sequenced (besides *J. curcas*), also *J. integerrima*, *J. gossypifolia*, *J. minor*, *J. molissima* and *J. podagrica*, but the sequences were not satisfactory, so far. We also tried to align our partial sequences with ITS sequences deposited in the GenBank (*J. molissima*, *J. minor*, *J. podagrica*, *J. gossypifolia*, *J. multifida*, *J. integerrima*, *J. tanjorensis* and *J. glandulifera*, but only for three accessions (Table 1, Figure 3) adequate alignments could be generated.

After some trials a region containing 290 bp could be aligned, generating the phenogram by neighbor-joining method presented in Figure 3, whereas we had to add one physic nut, two *Jatropha* and three *Croton* species from GenBank (NCBI; Table 1) to generate a phenogram. From the 290 aligned nucleotides, 229 were conserved, whereas 60 were variable and only 44 parsimony-informative. As expected, the *J. curcas* accessions (all from IAC germplasm) grouped in a clade with a high bootstrap (97) but low intraspecies diversity and polytomies (Figure 3). The most diverging accession was J85 (regarding IAC accession A6 – L3P27), similar to a GenBank accession (AM774639), being most dissimilar to J124 (IAC accession A16-L12P19).

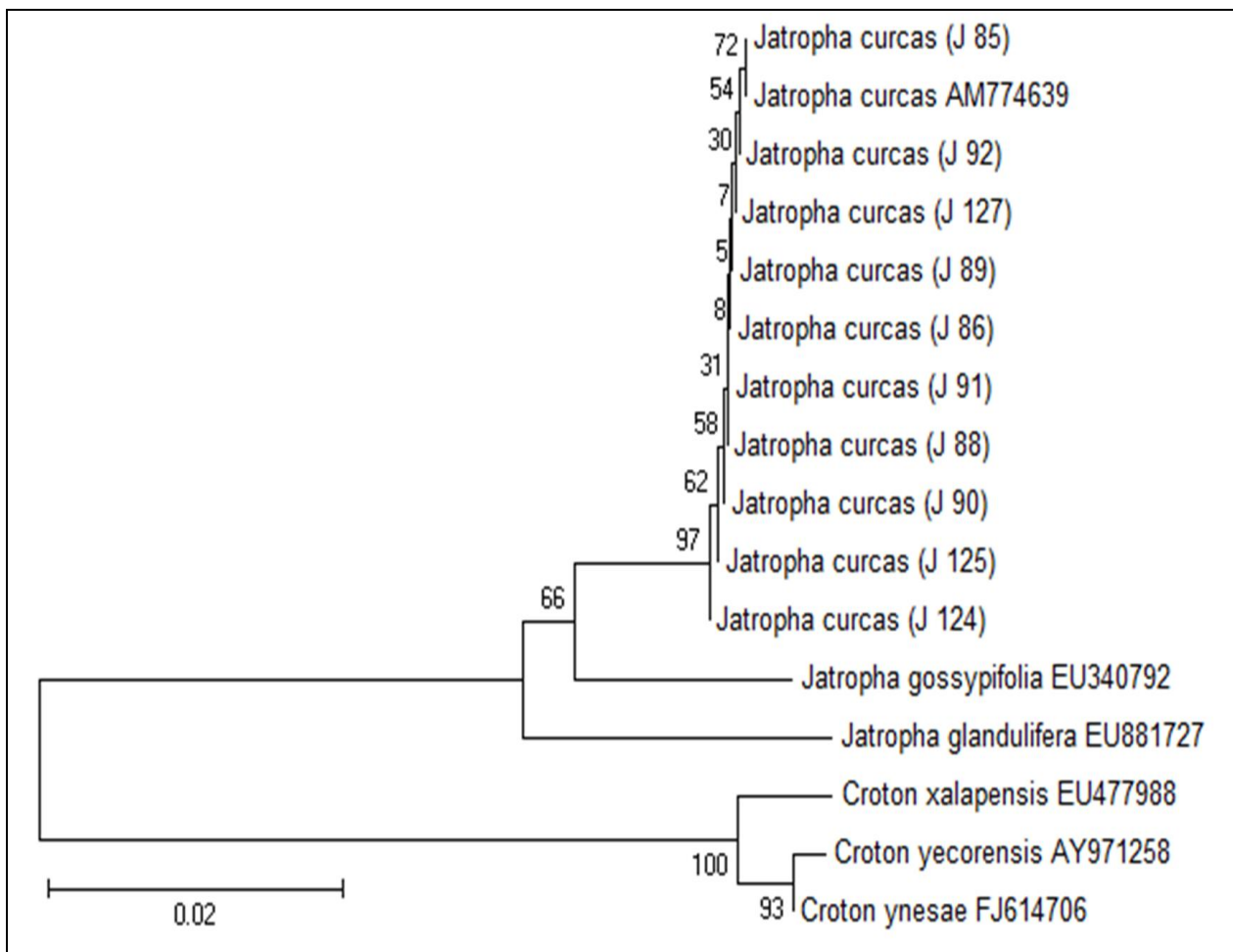


Figure 3. Phenogram generated by ITS sequencing data using 10 *Jatropha curcas* accessions from IAC (Instituto Agronômico de Campinas) germplasm bank, as compared with some related species. Numbers at the base of the branches regard bootstrap values.

Considering the position of the two other *Jatropha* species aligned (both from GenBank), the most dissimilar was *J. glandulifera* (EU881727), while *J. gossypifolia* (EU340792) grouped with the physic nut group with a low bootstrap (66). The highest bootstrap value (100) was observed in the basal *Croton* group, whereas the intergeneric (*Croton/Jatropha*) node presented no statistical support. The single evaluation on *Jatropha* interspecific relationships was also based on ITS-1, being carried out by Pamidimarri *et al.* (2009), also positioning *J. gossypifolia* as more related to *J. curcas* than *J. glandulifera*, a result confirmed by the present evaluation.

Concluding remarks and perspectives

Based on molecular markers and accessions evaluated low polymorphism levels were observed for both DAF and ISSR in *J. curcas* accessions evaluated, whereas ISSR was a little more informative than DAF. On the other hand, this results may be changed if a higher number

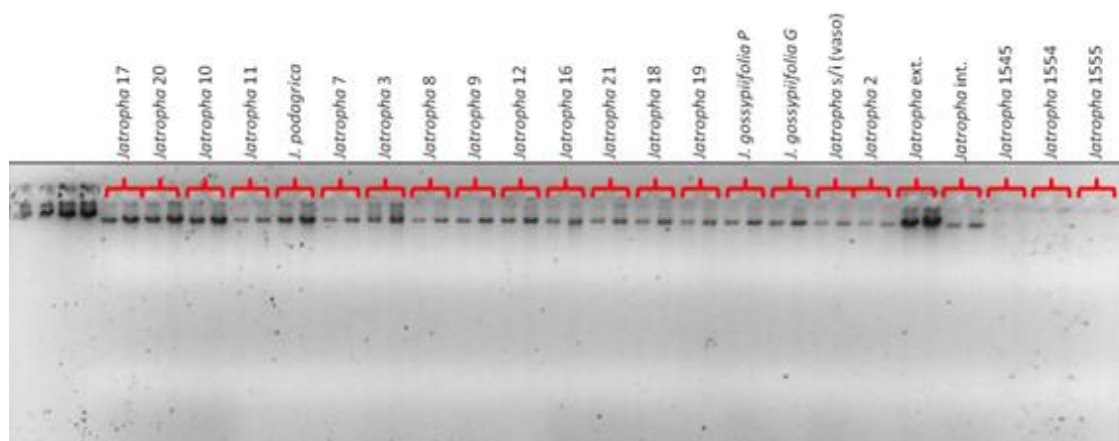
of markers or sequences had been tested, a task that our groups aims to developed in the future, considering the significant number of accessions available in our DNA bank (Supplementary Table S2), that includes 88 physic nut accessions and other 10 different *Jatropha* species as well as many related species not yet studied including unexploited members of the genera *Cnidoscolus*, *Manihot* and *Croton*, all from the Crotonoidae subfamily.

REFERENCES

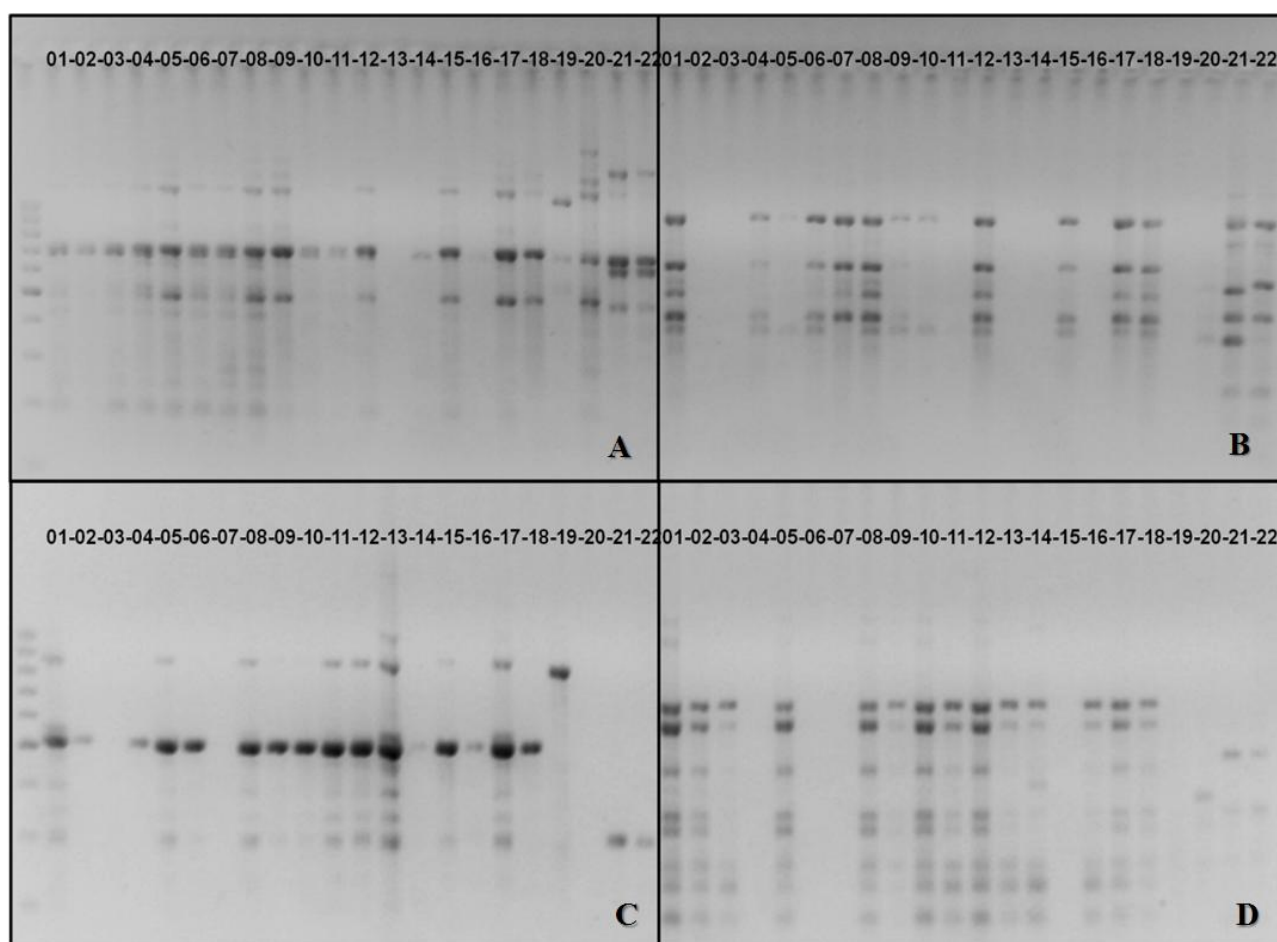
- ALTSCHUL, S. F. *et al.* Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, p. 3389–3402, 1997.
- BALDWIN *et al.* The ITS region of nuclear ribosomal DNA-A valuable source of evidence on Angiosperm phylogeny. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 82, p. 247–277, 1995.
- BASHA S. D.; M. SUJATHA. Inter and intra-population variability of *Jatropha curcas* (L.) characterized by RAPD and ISSR markers and development of population-specific SCAR markers. **Euphytica**, v. 156, p. 375–386, 2007.
- 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**, v. 176, p. 812–823, 2009.
- BECHARA, M D. *et al.* Phylogenetic relationships in genus *Arachis* based on ITS and 5.8S rDNA sequences. **BMC Plant Biology**, v. 10, p. 255, 2010.
- BENKO-ISEPPON, A.M. *et al.* Molecular markers closely linked to *Fusarium* resistance genes in chickpea show significant alignments to pathogenesis-related genes located on *Arabidopsis* chromosomes 1 and 5. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 107, p. 379–386, 2003.
- FALEIRO, F. G. Marcadores genético-moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos. Ed. EMBRAPA, p.102, 2007.
- HALL, B. G. **Phylogenetic Trees Made Easy: A How-to Manual for Molecular Biologists**. Massachusetts U.S.A.: Sinauer Associates, Inc., 2001.
- HILLIS D. M.; DIXON M. T. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. **Quarterly Review of Biology** v. 66, p. 411–453, 1991.
- KUMAR, R.V *et al.* Genetic diversity and relationships among germplasm of *Jatropha curcas* L. revealed by RAPDs. **Trees-Structure and Function**, v. 23, p. 1075–1079, 2009.

- LAURENTIN, H.; KARLOVSKY, P. AFLP fingerprinting of sesame (*Sesamum indicum* L.) cultivars: identification, genetic relationship and comparison of AFLP informativeness parameters. **Genetics Resource and Crop Evolution**, v. 54, p. 1437–1446, 2007.
- LEAL, C. K. A.; AGRA, M. F. Estudo Farmacobotânico Comparativo das folhas de *Jatropha molissima* (Pohl) Baill. e *Jatropha ribifolia* (Pohl) Baill. (Euphorbiaceae). **Acta Farmacéutica Bonaerense** v. 24, n. 1, p. 5–13, 2005.
- MARQUES, D. A.; FERRARI, R. A. O papel das novas biotecnologias no melhoramento genético do pinhão-manso. **Biológico**, São Paulo, v. 70, n. 2, p. 65–67, 2008.
- MICHAELS S. D.; JOHN M. C.; AMASINO R. M. Removal of polysaccharides from plant DNA by ethanol precipitation. **Biotechniques**, v. 17, p. 274–276, 1994.
- PAMIDIMARRI, D.V.N.S.; CHATTOPADHYAY, B.; REDDY, M.P. Genetic divergence and phylogenetic analysis of genus *Jatropha* based on nuclear ribosomal DNA ITS sequence. **Molecular Biology Reports** v. 36, p. 1929–1935. 2009.
- PRADEEP REDDY, M. *et al.* Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. **Euphytica**, v. 128, p. 9–17, 2002.
- PREVOST, A.; WILKINSON, M. J. A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. **Theoretical and Applied Genetics** v. 98, p. 107–112, 1999.
- PUROHIT, A. R.; VERMA, P.U. and PATEL, N.J. Rapid and Efficient Procedure for Isolation of High Yielding DNA from Castor (*Ricinus communis* L.). **International Journal of Scientific and Research Publications**, v. 2, No. 7, p. 1–4. 2012.
- RAM, S. G *et al.* Genetic diversity among *Jatropha* species as revealed by RAPD markers, **Genetics Resources and Crop Evolution**, v. 55, p. 803–809, 2008.
- ROGSTAD, S. H. Saturated NaCl-CTAB Solution as a Means of Field Preservation of Leaves for DNA Analyses. **Taxon**, Vol. 41, No. 4, pp. 701–708, 1992.
- ROLDÁN-RUIZ, I. *et al.* AFLP markers reveal high polymorphic rates in ryegrasses (*Lolium* spp.). **Molecular Breeding**, v. 6, p. 125–134, 2000.
- ROSADO, T. B. *et al.* Molecular Markers Reveal Limited Genetic Diversity in a Large Germplasm Collection of the Biofuel Crop *Jatropha curcas* L. in Brazil. **Crop Science**, v. 50, p. 2372 –2382, 2010.
- SATURNINO, H. M. *et al.* Cultura do pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.). In: Produção de oleaginosas para biodiesel. **Informe agropecuário**, Belo Horizonte, v. 26, n. 229, p. 44–74, 2005.
- SHARMA S. *et al.* Internal transcribed spacer (ITS) sequences of ribosomal DNA of wild barley and their comparison with ITS sequences in common wheat. **Barley Genetics Newsletters**, v. 32, p. 38–45, 2002.

- SUBRAMANYAM, K., D. *et al.* Genetic diversity assessment of wild and cultivated varieties of *Jatropha curcas* (L.) in India by RAPD analysis. **African Journal of Biotechnology** v. 8, p. 1900–1910, 2009.
- SUJATHA, M.; REDDY, T.P.; MAHASI, M.J. Role of biotechnological interventions in the improvement of castor (*Ricinus communis* L.) and *Jatropha curcas* L. **Biotechnology Advances**, v. 26, p. 424–435, 2008.
- SUN, Q. B. *et al.* SSR and AFLP Markers Reveal Low Genetic Diversity in the Biofuel Plant *Jatropha curcas* in China. **Crop Science**, v. 48, p. 1865-1871, 2008.
- TAMURA, K. *et al.* MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Molecular Biology and Evolution**, v. 28, p. 2731–2739, 2011.
- TATIKONDA, L. *et al.* AFLP-based molecular characterization of an elite germplasm collection of *Jatropha curcas* L., a biofuel plant. **Plant Science**, v. 176, p. 505–513, 2009.
- THOMPSON J. D., HIGGINS D. G., GIBSON T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. **Nuclear Acids Research**, v. 22, p. 4673–4680, 1994.
- VARSHNEY, R. K., *et al.* Comparative assessment of EST-SSR, EST-SNP and AFLP markers for evaluation of genetic diversity and conservation of genetic resources using wild, cultivated and elite barleys. **Plant Science**, v. 173, p. 638–649, 2007.
- WEISING, K. *et al.* **DNA fingerprinting in plants and fungi**. CRC Press, Boca Raton, 322 pp, 1995.
- WINTER, P.; KAHL, G. Molecular marker technologies for plant improvement. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 11, p. 438–448, 1995.
- YADAV, H. K. *et al.* EST-derived SSR markers in *Jatropha curcas* L.: development, characterization, polymorphism, and transferability across the species/genera. **Tree Genetics & Genomes**, v. 7, p. 207–219, 2011.
- YANO, O. *et al.* Molecular phylogeny of Japanese *Eleocharis* (Cyperaceae) based on ITS sequence data, and chromosomal evolution. **Journal of Plant Research**, v. 117, p. 409–419, 2004.



Supplementary Figure S1. Agarose gel (1.2%) illustrating the quality of the extracted DNA from some *Jatropha* accessions used, as compared with λ Phage DNA as a reference.



Supplementary Figure S2. Agarose gel (1.8%) illustrating amplification products of *Jatropha curcas* (01-18), *J. mollissima* (19-20) and *J. gossypifolia* (21-22) using primers OPL07 (A), OPL11 (B), UBC808 (C) and UBC809 (D) in 22 accessions (not all evaluated due to lack of amplification).

Supplementary Table S1. Results after BLASTn alignment of the obtained sequences against GenBank (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Due to the low quality of some sequences, they have been removed from the final alignment that generated the phenogram.

Name	Size	Score	E-value	Identity	Gaps	Sense	Accession	Species	Description
<i>J. curcas</i> - J85	966	809 bits(438)	0.0	452/461(98%)	1/461(0%)	Plus/Plus	JX459034.1	<i>J. curcas</i>	ITS1p and ITS2p
<i>J. curcas</i> - J85	1003	974 bits(527)	0.0	548/563(97%)	2/563(0%)	Plus/Minus	JQ898646.1	<i>Vernicia fordii</i>	ITS1 and ITS2
<i>J. curcas</i> - J88	934	669 bits(362)	0.0	433/477(91%)	7/477(1%)	Plus/Plus	JQ898646.1	<i>Vernicia fordii</i>	ITS1 and ITS2
<i>J. curcas</i> - J88	984	974 bits(527)	0.0	540/550(98%)	2/550(0%)	Plus/Minus	Q898646.1	<i>Vernicia fordii</i>	ITS1 and ITS2
<i>J. curcas</i> - J98	974	728 bits(394)	0.0	429/458(94%)	1/458(0%)	Plus/Plus	JX459034.1	<i>J. curcas</i>	ITS1p and ITS2p
<i>J. curcas</i> - J98	923	1138 bits(616)	0.0	630/641(98%)	0/641(0%)	Plus/Minus	AM774639.1	<i>J. curcas</i>	ITS1 and ITS2
<i>J. curcas</i> - J99	971	789 bits(427)	0.0	449/463(97%)	3/463(0%)	Plus/Plus	JX459000.1	<i>J. curcas</i>	ITS1p and ITS2p
<i>J. curcas</i> - J99	982	1005 bits(544)	0.0	558/566(99%)	3/566(0%)	Plus/Minus	JQ898646.1	<i>Vernicia fordii</i>	ITS1 and ITS2
<i>J. curcas</i> - J101	983	754 bits(408)	0.0	425/437(97%)	2/437(0%)	Plus/Plus	EU700455.1	<i>J. curcas</i>	ITS1p and ITS2p
<i>J. curcas</i> - J101	992	961 bits(520)	0.0	538/550(98%)	3/550(0%)	Plus/Minus	JQ898646.1	<i>Vernicia fordii</i>	ITS1 and ITS2
<i>J. curcas</i> - J103	990	883 bits(478)	0.0	495/505(98%)	3/505(0%)	Plus/Plus	EU700455.1	<i>J. curcas</i>	ITS1p and ITS2p
<i>J. curcas</i> - J103	984	981 bits(531)	0.0	550/564(98%)	2/564(0%)	Plus/Minus	JQ898646.1	<i>Vernicia fordii</i>	ITS1 and ITS2
<i>J. curcas</i> - J104	992	929 bits(503)	0.0	534/556(96%)	5/556(0%)	Plus/Plus	JQ898646.1	<i>Vernicia fordii</i>	ITS1 and ITS2
<i>J. curcas</i> - J104	992	939 bits(508)	0.0	515/519(99%)	2/519(0%)	Plus/Minus	AM774639.1	<i>J. curcas</i>	ITS1 and ITS2
<i>J. curcas</i> - J105	992	948 bits(513)	0.0	536/556(96%)	1/556(0%)	Plus/Plus	EU700455.1	<i>J. curcas</i>	ITS1p and ITS2p
<i>J. curcas</i> - J105	1020	970 bits(525)	0.0	542/553(98%)	3/553(0%)	Plus/Minus	JQ898646.1	<i>Vernicia fordii</i>	ITS1 and ITS2
<i>J. curcas</i> - J106	994	828 bits(448)	0.0	470/485(97%)	3/485(0%)	Plus/Plus	JQ898646.1	<i>Vernicia fordii</i>	ITS1 and ITS2
<i>J. curcas</i> - J106	968	662 bits(358)	0.0	380/399(95%)	2/399(0%)	Plus/Minus	JQ898646.1	<i>Vernicia fordii</i>	ITS1 and ITS2
<i>J. curcas</i> - J108	969	569 bits(308)	1,00E-159	334/354(94%)	3/354(0%)	Plus/Plus	EU700455.1	<i>J. curcas</i>	ITS1p and ITS2p
<i>J. curcas</i> - J108	974	780 bits(422)	0.0	448/471(95%)	1/471(0%)	Plus/Minus	AM774639.1	<i>J. curcas</i>	ITS1 and ITS2
<i>J. curcas</i> - J117	982	841 bits(455)	0.0	469/476(99%)	3/476(0%)	Plus/Plus	EU700455.1	<i>J. curcas</i>	ITS1p and ITS2p
<i>J. curcas</i> - J117	980	749 bits(405)	0.0	420/432(97%)	2/432(0%)	Plus/Minus	JQ898646.1	<i>Vernicia fordii</i>	ITS1 and ITS2
<i>J. curcas</i> - J124	957	819 bits(443)	0.0	462/476(97%)	1/476(0%)	Plus/Plus	JQ898646.1	<i>Vernicia fordii</i>	ITS1 and ITS2
<i>J. curcas</i> - J124	990	881 bits(477)	0.0	494/503(98%)	3/503(0%)	Plus/Minus	JQ898646.1	<i>Vernicia fordii</i>	ITS1 and ITS2
<i>J. curcas</i> - J125	982	1197 bits(648)	0.0	662/673(98%)	1/673(0%)	Plus/Plus	JQ898646.1	<i>Vernicia fordii</i>	ITS1 and ITS2
<i>J. curcas</i> - J125	983	944 bits(511)	0.0	544/567(96%)	4/567(0%)	Plus/Minus	AM774639.1	<i>J. curcas</i>	ITS1 and ITS2
<i>J. curcas</i> - J127	1014	1208 bits(654)	0.0	666/673(99%)	2/673(0%)	Plus/Plus	JQ898646.1	<i>Vernicia fordii</i>	ITS1 and ITS2
<i>J. curcas</i> - J127	959	872 bits(472)	0.0	490/501(98%)	3/501(0%)	Plus/Minus	JQ898646.1	<i>Vernicia fordii</i>	ITS1 and ITS2
<i>J. molissima</i> - J13	545	411 bits(222)	3,00E-112	425/522(81%)	33/522(6%)	Plus/Plus	AF455748.1	<i>Lycium chinense</i>	ITS1 and ITS2
<i>J. molissima</i> - J13	545	401 bits(217)	2,00E-109	450/560(80%)	37/560(6%)	Plus/Minus	AF455748.1	<i>Lycium chinense</i>	ITS1 and ITS2
<i>J. minor</i> - J83	967	647 bits(350)	0.0	408/440(93%)	3/440(0%)	Plus/Plus	JX459019.1	<i>J. sp.</i>	ITS1p and ITS2p
<i>J. minor</i> - J83	978	708 bits(383)	0.0	442/474(93%)	3/474(0%)	Plus/Minus	JQ898646.1	<i>Vernicia fordii</i>	ITS1 and ITS2
<i>J. podagryca</i> - J114	976	634 bits(343)	4,00E-179	472/533(89%)	19/533(3%)	Plus/Plus	JQ898646.1	<i>Vernicia fordii</i>	ITS1 and ITS2
<i>J. podagryca</i> - J114	994	725 bits(392)	0.0	470/507(93%)	10/507(1%)	Plus/Minus	JQ898646.1	<i>Vernicia fordii</i>	ITS1 and ITS2
<i>J. gossypifolia</i> - J126	1005	1026 bits(555)	0.0	634/673(94%)	3/673(0%)	Plus/Plus	JQ898646.1	<i>Vernicia fordii</i>	ITS1 and ITS2
<i>J. gossypifolia</i> - J126	995	941 bits(509)	0.0	522/530(98%)	3/530(0%)	Plus/Minus	EU881724.1	<i>J. gossypifolia</i>	ITS1p and ITS2p
<i>J. integerrima</i> - J81	989	758 bits(410)	0.0	504/576(88%)	3/576(0%)	Plus/Plus	AY971261.1	<i>J. integerrima</i>	ITS1 and ITS2
<i>J. integerrima</i> - J81	959	749 bits(405)	0.0	439/458(96%)	5/458(1%)	Plus/Minus	AY971261.1	<i>J. integerrima</i>	ITS1 and ITS2

Abbreviations: J.=*Jatropha*; M.=*Manihot*. Reference germplasm banks: Emb-CG=Embrapa Campina Grande, Paraíba, Brazil; IAC=Instituto Agronômico de Campinas, São Paulo, Brazil; UFPE= Universidade Federal de Pernambuco, Bank of the Plant Genetics and Biotechnology Laboratory (LGBV) Recife, Pernambuco, Brazil; UFRPE= Universidade Federal Rural de Pernambuco; NAT=Collected in the nature; PGT=Palmengarten of the City Frankfurt. -x- = no data or no material; “-” = not analyzed or unsatisfactory; “+” = average; “+” = good; “++” = excellent. Fo=leaves; Pl=Plantlets; Ou=other tissues.

Supplementary Table S2. DNA bank available at Universidade Federal de Pernambuco aiming future works with the selected markers and also additional inferences.

Internal Code	Species	Accession ID and name	Reference Bank or Provenance	Preserved Material CTAB available	Fresh Material	MaxiPrep Extraction Efficiency	RNAse treatment	Polyssacc-haride precipitation	DNA Quantification ng/uL	PCR worked?	# Primers tested	Sequenced ITS-1 Size (bp)	Plants under cultiv. or seeds	Complementary data
J37	<i>Cnidoscopus</i> sp.	1577	NAT	Fo	-x-	-	-	-	-	Yes	1 (ITS)	537 a 539	-	-
J01	<i>J. curcas</i>	XVI, Garanhuns	Emb-CG	-x-	PI	++	Yes	Yes	378,5	-	4 (2 DAF, 2 ISSR)	-	1	s-2740
J02	<i>J. curcas</i>	I, Sumé (Estacas)	Emb-CG	-x-	PI	+	Yes	Yes	171,9	Yes	4 (2 DAF, 2 ISSR)	-	3	F1 available
J03	<i>J. curcas</i>	XIII, Peru	Emb-CG	-x-	PI	+	Yes	Yes	96,3	-	4 (2 DAF, 2 ISSR)	-	1	-
J04	<i>J. curcas</i>	XIII, Peru	Emb-CG	-x-	PI	+	Yes	Yes	126,4	-	4 (2 DAF, 2 ISSR)	-	1	-
J05	<i>J. curcas</i>	VII, El Salvador	Emb-CG	-x-	PI	+	Yes	Yes	120,4	-	4 (2 DAF, 2 ISSR)	-	1	-
J06	<i>J. curcas</i>	I, Sumé (Estacas)	Emb-CG	-x-	PI	+/-	Yes	Yes	10,0	-	4 (2 DAF, 2 ISSR)	-	3	s-2731
J07	<i>J. curcas</i>	X, Marisópolis	Emb-CG	-x-	PI	++	Yes	Yes	392,9	-	4 (2 DAF, 2 ISSR)	-	1	s-2828
J08	<i>J. curcas</i>	XIV, Mundo Novo	Emb-CG	-x-	PI	+	Yes	Yes	122,2	-	4 (2 DAF, 2 ISSR)	-	1	-
J09	<i>J. curcas</i>	XII, Seeds	Emb-CG	-x-	-x-	+	Yes	Yes	139,1	-	4 (2 DAF, 2 ISSR)	-	1	-
J10	<i>J. curcas</i>	XVII, Patos-PB	Emb-CG	-x-	PI	+	Yes	Yes	151,1	Yes	32 (16 DAF, 16 ISSR)	-	1	-
J11	<i>J. curcas</i>	XV, São Miguel do Araguaia	Emb-CG	-x-	PI	+	Yes	Yes	150,1	-	4 (2 DAF, 2 ISSR)	-	1	-
J12	<i>J. curcas</i>	II, Colombia	Emb-CG	-x-	-x-	+	Yes	Yes	84,5	Yes	32 (16 DAF, 16 ISSR)	-	1	-
J14	<i>J. curcas</i>	LGBV-Glasshouse	UFPE	-x-	PI	++	Yes	Yes	257,3	Yes	4 (2 DAF, 2 ISSR)	-	1	-
J16	<i>J. curcas</i>	I, Sumé (Estacas)	Emb-CG	Fo	-x-	+	Yes	Yes	156,2	Yes	4 (2 DAF, 2 ISSR)	-	-	-
J17	<i>J. curcas</i>	II, Colombia	Emb-CG	Fo	-x-	+	Yes	Yes	84,1	Yes	4 (2 DAF, 2 ISSR)	-	-	-
J18	<i>J. curcas</i>	III, Petrolina	Emb-CG	Fo	-x-	+	Yes	Yes	145,1	Yes	4 (2 DAF, 2 ISSR)	-	-	-
J19	<i>J. curcas</i>	IV, Tocantinópolis, Plant 2	Emb-CG	Fo	-x-	++	Yes	Yes	201,0	Yes	4 (2 DAF, 2 ISSR)	-	-	-
J20	<i>J. curcas</i>	V, Petrolina, Plant 2	Emb-CG	Fo	-x-	+	Yes	Yes	108,2	Yes	4 (2 DAF, 2 ISSR)	-	-	-
J21	<i>J. curcas</i>	VI, Oliveira de Fátima, Plant 1	Emb-CG	Fo	-x-	+/-	Yes	Yes	56,4	Yes	4 (2 DAF, 2 ISSR)	-	-	-
J22	<i>J. curcas</i>	VII, El Salvador, Plant 2	Emb-CG	Fo	-x-	++	Yes	Yes	248,5	Yes	4 (2 DAF, 2 ISSR)	-	-	-
J23	<i>J. curcas</i>	VIII, Estacas, Plant 1	Emb-CG	Fo	-x-	+/-	Yes	Yes	79,0	Yes	4 (2 DAF, 2 ISSR)	-	-	-
J24	<i>J. curcas</i>	IX, Patos-PB, Plant 1	Emb-CG	Fo	-x-	+/-	Yes	Yes	63,2	Yes	4 (2 DAF, 2 ISSR)	-	-	-
J25	<i>J. curcas</i>	X, Marisópolis, Plant 1	Emb-CG	Fo	-x-	+	Yes	Yes	152,2	Yes	32 (16 DAF, 16 ISSR)	-	-	-
J26	<i>J. curcas</i>	XI, África, Plant 2	Emb-CG	Fo	-x-	+	Yes	Yes	149,2	Yes	4 (2 DAF, 2 ISSR)	-	-	-
J27	<i>J. curcas</i>	XII, Seeds, Plant 2	Emb-CG	Fo	-x-	+/-	Yes	Yes	95,5	Yes	32 (16 DAF, 16 ISSR)	-	-	-
J28	<i>J. curcas</i>	XIII, Perú, Plant 2	Emb-CG	Fo	-x-	+	Yes	Yes	170,5	Yes	4 (2 DAF, 2 ISSR)	-	-	-
J29	<i>J. curcas</i>	XIV, Mundo Novo, Plant 2	Emb-CG	Fo	-x-	+	Yes	Yes	115,8	Yes	4 (2 DAF, 2 ISSR)	-	-	-
J30	<i>J. curcas</i>	XV, São Miguel do Araguaia, Plant 1	Emb-CG	Fo	-x-	++	Yes	Yes	245,8	Yes	4 (2 DAF, 2 ISSR)	-	-	-
J31	<i>J. curcas</i>	XVI, Garanhuns, Plant 1	Emb-CG	Fo	-x-	++	Yes	Yes	235,8	Yes	4 (2 DAF, 2 ISSR)	-	-	-
J32	<i>J. curcas</i>	XVII, Patos-PB, Plant 5	Emb-CG	Fo	-x-	+	Yes	Yes	172,7	Yes	4 (2 DAF, 2 ISSR)	-	-	-
J84	<i>J. curcas</i>	Q153/11	IAC	Fo	-x-	++	Yes	Yes	569,6	Yes	1 (ITS)	-	-	-
J85	<i>J. curcas</i>	L3P27	IAC	Fo	-x-	++	Yes	Yes	2197,7	Yes	1 (ITS)	885 a 1037	-	-
J86	<i>J. curcas</i>	L4P19	IAC	Fo	-x-	++	Yes	Yes	394,6	Yes	1 (ITS)	993 a 997	-	-
J87	<i>J. curcas</i>	L6P31	IAC	Fo	-x-	++	Yes	Yes	1984,1	Yes	1 (ITS)	-	-	-

Abbreviations: J.=*Jatropha*; M.=*Manihot*. Reference germplasm banks: Emb-CG=Embrapa Campina Grande, Paraíba, Brazil; IAC=Instituto Agrônomo de Campinas, São Paulo, Brazil; UFPE= Universidade Federal de Pernambuco, Bank of the Plant Genetics and Biotechnology Laboratory (LGBV) Recife, Pernambuco, Brazil; UFRPE= Universidade Federal Rural de Pernambuco; NAT=Collected in the nature; PGT=Palmengarten of the City Frankfurt. -x- = no data or no material; “-” = not analyzed or unsatisfactory; “+/-” =average; “+” = good; “++” =excellent. Fo=leaves; PI=Plantlets; Ou=other tissues.

Suppl. Table S2, continuation.

Internal Code	Species	Accession ID and name	Reference Bank or Provenance	Preserved Material CTAB available	Fresh Material	MaxiPrep Extraction Efficiency	RNAse treatment	Polyssaccharide precipitation	DNA Quantification ng/uL	PCR worked?	# Primers tested	Sequenced ITS-1 Size (bp)	Plants under cultiv. or seeds	Complementary data
J88	<i>J. curcas</i>	L6P7	IAC	Fo	-x-	++	Yes	Yes	1721,0	Yes	1 (ITS)	616 a 1013	-	-
J89	<i>J. curcas</i>	L1P7	IAC	Fo	-x-	++	Yes	Yes	897,9	Yes	1 (ITS)	325 a 1001	-	-
J90	<i>J. curcas</i>	L10P5	IAC	Fo	-x-	++	Yes	Yes	2965,3	Yes	1 (ITS)	161 a 1116	-	-
J91	<i>J. curcas</i>	L8P29	IAC	Fo	-x-	++	Yes	Yes	826,9	Yes	1 (ITS)	945 a 1115	-	-
J92	<i>J. curcas</i>	Q153/11 A4	IAC	Fo	-x-	++	Yes	Yes	227,2	Yes	1 (ITS)	150 a 979	-	-
J93	<i>J. curcas</i>	L11P2	IAC	Fo	-x-	++	Yes	Yes	311,2	Yes	1 (ITS)	976 a 1062	-	-
J95	<i>J. curcas</i>	L2P31-A	IAC	Fo	-x-	++	Yes	Yes	1027,7	Yes	1 (ITS)	985 a 1054	-	-
J96	<i>J. curcas</i>	L5P48	IAC	Fo	-x-	++	Yes	Yes	827,5	Yes	1 (ITS)	898 a 1076	-	-
J98	<i>J. curcas</i>	L11P7	IAC	Fo	-x-	++	Yes	Yes	622,2	Yes	1 (ITS)	923 a 974	-	-
J99	<i>J. curcas</i>	L12P2	IAC	Fo	-x-	++	Yes	Yes	457,7	Yes	1 (ITS)	971 a 982	-	-
J101	<i>J. curcas</i>	L12P8	IAC	Fo	-x-	++	Yes	Yes	797,3	Yes	1 (ITS)	931 a 1009	-	-
J102	<i>J. curcas</i>	L6P25	IAC	Fo	-x-	++	Yes	Yes	1803,8	Yes	1 (ITS)	961 a 1120	-	-
J103	<i>J. curcas</i>	L13P2	IAC	Fo	-x-	++	Yes	Yes	2233,9	Yes	1 (ITS)	984 a 990	-	-
J104	<i>J. curcas</i>	ATPL Mexicana	IAC	Fo	-x-	++	Yes	Yes	372,8	Yes	1 (ITS)	992	-	-
J105	<i>J. curcas</i>	Q153/11 A10	IAC	Fo	-x-	++	Yes	Yes	411,8	Yes	1 (ITS)	945 a 1143	-	-
J106	<i>J. curcas</i>	Q153/11 A20	IAC	Fo	-x-	++	Yes	Yes	1885,5	Yes	1 (ITS)	319 a 1101	-	-
J107	<i>J. curcas</i>	L9P49	IAC	Fo	-x-	++	Yes	Yes	1651,6	Yes	1 (ITS)	372 a 1111	-	-
J108	<i>J. curcas</i>	L12P29	IAC	Fo	-x-	++	Yes	Yes	1602,2	Yes	1 (ITS)	969 a 1117	-	-
J109	<i>J. curcas</i>	L6P7	IAC	Fo	-x-	++	Yes	Yes	4338,9	Yes	1 (ITS)	975 a 1164	-	-
J110	<i>J. curcas</i>	Q153/11 A5	IAC	Fo	-x-	++	Yes	Yes	590,0	Yes	1 (ITS)	1008	-	-
J111	<i>J. curcas</i>	L9P32	IAC	Fo	-x-	++	Yes	Yes	1264,2	Yes	1 (ITS)	906 a 997	-	-
J112	<i>J. curcas</i>	L8P52	IAC	Fo	-x-	++	Yes	Yes	895,3	No	1 (ITS)	-	-	-
J113	<i>J. curcas</i>	L3P29	IAC	Fo	-x-	++	Yes	Yes	2945,5	No	1 (ITS)	-	-	-
J116	<i>J. curcas</i>	L3P39-A	IAC	Fo	-x-	++	Yes	Yes	405,0	Yes	1 (ITS)	-	-	-
J117	<i>J. curcas</i>	L13P4	IAC	Fo	-x-	++	Yes	Yes	309,7	Yes	1 (ITS)	980 a 982	-	-
J118	<i>J. curcas</i>	L9P1	IAC	Fo	-x-	++	Yes	Yes	692,5	Yes	1 (ITS)	-	-	-
J119	<i>J. curcas</i>	L12P23	IAC	Fo	-x-	++	Yes	Yes	1119,5	Yes	1 (ITS)	1029	-	-
J120	<i>J. curcas</i>	L2P21	IAC	Fo	-x-	++	Yes	Yes	2755,5	No	1 (ITS)	-	-	-
J121	<i>J. curcas</i>	L2P23	IAC	Fo	-x-	++	Yes	Yes	1992,6	Yes	1 (ITS)	-	-	-
J122	<i>J. curcas</i>	L8P54	IAC	Fo	-x-	++	Yes	Yes	1242,5	Yes	1 (ITS)	617 a 958	-	-
J123	<i>J. curcas</i>	L6P11	IAC	Fo	-x-	++	Yes	Yes	1972,7	No	1 (ITS)	618 a 1091	-	-
J124	<i>J. curcas</i>	L12P19	IAC	Fo	-x-	++	Yes	Yes	2200,8	Yes	1 (ITS)	957 a 990	-	-
J125	<i>J. curcas</i>	L2P19	IAC	Fo	-x-	++	Yes	Yes	1425,5	Yes	1 (ITS)	982 a 983	-	-
J127	<i>J. curcas</i>	L12P4	IAC	Fo	-x-	++	Yes	Yes	758,1	Yes	1 (ITS)	959 a 1014	-	-
J15	<i>J. gossypifolia</i>	LGBV-Glasshouse	UFPE	-x-	PI	+	Yes	Yes	98,1	Yes	4 (2 DAF, 2 ISSR)	-	3	F1 available

Abbreviations: J.=*Jatropha*; M.=*Manihot*. Reference germplasm banks: Emb-CG=Embrapa Campina Grande, Paraíba, Brazil; IAC=Instituto Agronômico de Campinas, São Paulo, Brazil; UFPE= Universidade Federal de Pernambuco, Bank of the Plant Genetics and Biotechnology Laboratory (LGBV) Recife, Pernambuco, Brazil; UFRPE= Universidade Federal Rural de Pernambuco; NAT=Collected in the nature; PGT=Palmengarten of the City Frankfurt. -x- = no data or no material; “-” = not analyzed or unsatisfactory; “+” = average; “++” = good; “+++” = excellent. Fo=leaves; PI=Plantlets; Ou=other tissues.

Suppl. Table S2, continuation.

Internal Code	Species	Accession ID and name	Reference Bank or Provenance	Preserved Material CTAB available	Fresh Material	MaxiPrep Extraction Efficiency	RNAse treatment	Polyssaccharide precipitation	DNA Quantification ng/uL	PCR worked?	# Primers tested	Sequenced ITS-1 Size (bp)	Plants under cultiv. or seeds	Complementary data
J34	<i>J. gossypifolia</i>	Campina Grande/PB	Emb-CG	Fo	-x-	+	Yes	Yes	85,4	Yes	4 (2 DAF, 2 ISSR)	-	-	-
J126	<i>J. gossypifolia</i>	-	IAC	Fo	-x-	++	Yes	Yes	951,2	Yes	1 (ITS)	437 a 1005	-	-
J80	<i>J. integerrima</i>	19899	PGT	Fo	-x-	-	Yes	Yes	-	Yes	1 (ITS)	151 a 176	-	-
J94	<i>J. integerrima</i>	-	IAC	Fo	-x-	++	Yes	Yes	1086,4	No	1 (ITS)	-	-	-
J81	<i>J. integerrima</i>	23673-1	PGT	Fo	-x-	-	Yes	Yes	-	Yes	1 (ITS)	343 a 989	-	-
J83	<i>J. minor</i>	25093-3	PGT	Fo	-x-	-	Yes	Yes	-	Yes	1 (ITS)	967 a 978	-	-
J13	<i>J. molissima</i>	LGBV-Glasshouse	UFPE	-x-	PI	++	Yes	Yes	265,4	Yes	32 (16 DAF, 16 ISSR)	545	2	F1 available
J33	<i>J. molissima</i>	Campina Grande/PB	Emb-CG	Fo	-x-	+	Yes	Yes	93,4	Yes	4 (2 DAF, 2 ISSR)	372	-	-
J35	<i>J. multifida</i>	1607	NAT	Fo	-x-	-	Yes	Yes	-	Yes	1 (ITS)	596	-	-
J115	<i>J. multifida</i>	-	IAC	Fo	-x-	++	Yes	Yes	477,3	Yes	1 (ITS)	920 a 969	-	-
J36	<i>J. mutabilis</i>	1574	NAT	Fo	-x-	-	Yes	Yes	-	No	1 (ITS)	-	-	-
J97	<i>J. podaricola</i>	-	IAC	Fo	-x-	+	Yes	Yes	193,5	Yes	1 (ITS)	-	-	-
J51	<i>J. podagrica</i>	1607	NAT	-x-	PI	++	Yes	Yes	-	Yes	1 (ITS)	-	1	-
J114	<i>J. podagrica</i>	-	IAC	Fo	-x-	++	Yes	Yes	661,5	Yes	1 (ITS)	976 a 994	-	-
J100	<i>J. pohliana</i>	-	IAC	Fo	-x-	++	Yes	Yes	913,8	Yes	1 (ITS)	280 a 931	-	-
J38	<i>J. ribifolia</i>	1578	NAT	Fo	-x-	+-	Yes	Yes	-	No	1 (ITS)	-	-	-
J67	<i>Jatropha</i> sp.	1545	NAT	Fo	-x-	+	Yes	Yes	-	Yes	1 (ITS)	687	-	-
J68	<i>Jatropha</i> sp.	1554	NAT	Fo	-x-	+-	Yes	Yes	-	No	1 (ITS)	-	-	-
J69	<i>Jatropha</i> sp.	1555	NAT	Fo	-x-	+-	Yes	Yes	-	No	1 (ITS)	-	-	-
J70	<i>Jatropha</i> sp.	1557	NAT	Fo	-x-	+-	Yes	Yes	-	No	1 (ITS)	-	-	-
J71	<i>Jatropha</i> sp.	1495	NAT	Fo	-x-	-	Yes	Yes	0	No	1 (ITS)	-	-	-
J72	<i>Jatropha</i> sp.	1491	NAT	Fo	-x-	-	Yes	Yes	0	No	1 (ITS)	-	-	-
J82	<i>Jatropha</i> sp.	12899	PGT	Fo	-x-	-	Yes	Yes	-	Yes	1 (ITS)	200 a 983	-	-
J78	<i>M. compositifolia</i>	GM-507	UFRPE	Fo	-x-	++	Yes	Yes	324,6	Yes	1 (ITS)	537 a 541	-	-
J76	<i>M. dichotoma</i>	GM-531	UFRPE	Fo	-x-	++	Yes	Yes	318,1	No	1 (ITS)	-	-	-
J74	<i>M. esculenta</i>	GM-26	UFRPE	Fo	-x-	++	Yes	Yes	429,7	No	1 (ITS)	-	-	-
J75	<i>M. esculenta</i>	BGM-0001	UFRPE	Fo	-x-	++	Yes	Yes	3338,2	No	1 (ITS)	-	-	-
J73	<i>M. flabelifolia</i>	GM-317	UFRPE	Fo	-x-	++	Yes	Yes	519,9	Yes	1 (ITS)	151 a 170	-	-
J79	<i>M. maracagensis</i>	GM-566	UFRPE	Fo	-x-	++	Yes	Yes	1888,7	No	1 (ITS)	-	-	-
J39	<i>Manihot</i> sp.	1592	NAT	Fo	-x-	-	Yes	Yes	-	-	1 (ITS)	-	-	-
J77	<i>M.maracagensis</i>	GM-566	UFRPE	Fo	-x-	++	Yes	Yes	1135,1	Yes	1 (ITS)	158 a 172	-	-

Abbreviations: J.=*Jatropha*; M.=*Manihot*. Reference germplasm banks: Emb-CG=Embrapa Campina Grande, Paraíba, Brazil; IAC=Instituto Agronômico de Campinas, São Paulo, Brazil; UFPE= Universidade Federal de Pernambuco, Bank of the Plant Genetics and Biotechnology Laboratory (LGBV) Recife, Pernambuco, Brazil; UFRPE= Universidade Federal Rural de Pernambuco; NAT=Collected in the nature; PGT=Palmenarten of the City Frankfurt. -x- = no data or no material; “-” = not analyzed or unsatisfactory; “+-” =average; “+” = good; “++” =excellent. Fo=leaves; PI=Plantlets; Ou=other tissues.

Conclusões

- Entre sete primers ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*) testados, os oligonucleotídeos UBC 808 e UBC 809 apresentaram o maior número de polimorfismos, apresentando ambos em média 78% de polimorfismo nos níveis intra- e interespecífico, conjuntamente, sendo recomendados para estudos futuros de diversidade em *Jatropha*.
- Entre os 13 iniciadores DAF (*DNA Amplification Fingerprinting*) testados, os primers OPL07 e OPL11 geraram o maior número de polimorfismos, apresentando ambos em média 44% de polimorfismos nos níveis intra- e interespecífico, conjuntamente, tornando-se interessantes para análises futuras envolvendo um maior número de acessos e espécies de *Jatropha*.
- A região parcialmente sequenciada de ITS-1 abrigou níveis modestos de polimorfismo entre os 10 acessos de pinhão-mansão analisados, além de moderado polimorfismo interespecífico considerando outras espécies de *Jatropha*. Tais resultados indicam que tal marcador é útil apenas para comparações interespecíficas em *Jatropha* ou supragenéricas comparativamente a outras Euphorbiaceae.

Anexo I. Instrução para autores: Revista Caatinga

**INSTRUÇÕES AOS AUTORES PARA PUBLICAÇÃO NA REVISTA CAATINGA, ISSN 0100-316X****(impresso) E 1983-2125 (on line)**

Atenção: As normas estão sujeitas a alterações, portanto, não deixe de consultá-las, como também, o modelo de artigo da Revista Caatinga (<http://periodico.caatinga.ufersa.edu.br/index.php/sistema>).

1 POLÍTICA EDITORIAL

A Revista Caatinga, publicada pela Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação (PPPG) da Universidade Federal Rural do Semiárido (UFERSA), apresenta periodicidade trimestral e destina-se à publicação de **artigos científicos e notas científicas envolvendo as áreas de ciências agrárias e recursos naturais**. Os artigos podem ser enviados e/ou publicados em Português, Inglês ou Espanhol, e devem ser originais, ainda não relatados ou submetidos à publicação em outro periódico ou veículo de divulgação.

Não será aceita a submissão de artigos escritos em línguas estrangeiras, cuja tradução tenha sido efetuada por programas computacionais, ficando na responsabilidade do Comitê Editorial decidir a necessidade de uma revisão da língua estrangeira, a qual será realizada por um revisor indicado pela Revista Caatinga e os custos cobertos pelo(s) autor(es). É requerida uma **taxa de submissão de R\$ 40,00 (quarenta reais)** por artigo submetido, a qual deverá ser depositada na conta apresentada abaixo. Solicita-se que, no momento do envio da cópia de pagamento da taxa de submissão, o autor informe o código da submissão. O pagamento da mesma **não significa** que a submissão do artigo será **aceita** pelo Comitê Editorial. A partir da segunda devolução, por irregularidade normativa, principalmente em se tratando das referências, o artigo terá a submissão cancelada e **não haverá devolução da taxa de submissão**. Portanto, **solicita-se aos autores** que verifiquem detalhadamente

se o documento se encontra em concordância com as **normas da Revista Caatinga**.

Recomenda-se aos autores tomar como referência o modelo de artigo disponível no site da revista.

Os trabalhos aprovados preliminarmente serão enviados a, pelo menos, dois revisores da área e publicados, somente, se aprovados pelos revisores e pelo corpo editorial. A publicação dos artigos será baseada na originalidade, qualidade e mérito científico, cabendo ao comitê editorial a decisão final do aceite. O sigilo de identidade dos autores e revisores será mantido durante todo o processo. A administração da revista tomará o cuidado para que os revisores de cada artigo sejam, obrigatoriamente, de instituições distintas daquela de origem dos autores. Artigo que apresentar mais de cinco autores não terá a sua submissão aceita pela Revista Caatinga, salvo algumas condições especiais.

Não é permitido mudanças no nome de autores *a posteriori*.

Após a aprovação do artigo pelo corpo editorial será solicitada do(s) autor(es) **uma taxa de publicação de R\$ 80,00** para pagamento de revisores das línguas espanhola, inglesa ou portuguesa e trabalhos de diagramação. Após o depósito, o(s) autor(es) encaminhará(ão) uma cópia do comprovante de pagamento para o e-mail: caatinga@ufersa.edu.br ou pelo **fax (84) 3315 1778**, informando o título do trabalho, nome do(s) autor(es) e seu código. O depósito deverá ser efetuado em nome da:

Salvador/Revista Caatinga

Banco do Brasil: Agência bancária: 3526-2; Conta poupança: 33.915-6; Variação: 01

Os dados, opiniões e conceitos emitidos nos artigos, bem como a exatidão das referências bibliográficas, são de inteira responsabilidade do(s) autor(es). Contudo o Editor, com assistência dos Consultores "ad

hoc", Comitê Editorial e do Conselho Científico, reservar-se-á o direito de sugerir ou solicitar modificações aconselháveis ou necessárias. Todos os artigos aprovados e publicados por esse periódico desde a sua fundação em 1976 estão disponíveis no site <http://caatinga.ufersa.edu.br/index.php/sistema>. A distribuição da forma impressa é de responsabilidade da Biblioteca Orlando Teixeira da Universidade Federal Rural do Semiárido sendo realizada por meio de permuta com bibliotecas brasileiras e do exterior.

Na submissão on line atentar para os seguintes itens:

1. A primeira versão do artigo deve omitir os nomes dos autores com suas respectivas notas de rodapé, bem como a nota de rodapé do título;
2. Somente, na versão final o artigo deve conter o nome de todos os autores com identificação em nota de rodapé, inclusive a do título;
3. Identificação, por meio de asterisco, do autor correspondente com endereço completo.

2 ORGANIZAÇÃO DO TRABALHO CIENTÍFICO

DIGITAÇÃO: o texto deve ser composto em programa Word (DOC ou RTF) ou compatível e os gráficos em programas compatíveis com o Windows, como Excel, e formato de imagens: Figuras (GIF) e Fotos (JPEG). Deve ter no máximo de 20 páginas, A4, digitado em espaço 1,5, fonte Times New Roman, estilo normal, tamanho doze e parágrafo recuado por 1 cm. Todas as margens deverão ter 2,5 cm. Páginas e linhas devem ser numeradas; os números de páginas devem ser colocados na margem inferior, à direita e as linhas numeradas de forma contínua. Se forem necessárias outras orientações, entre em contato com o Comitê Editorial ou consulte o último número da Revista Caatinga.

ESTRUTURA: o artigo científico deverá ser organizado em TÍTULO, NOME DO(S) AUTOR(ES), RESUMO, PALAVRAS-CHAVE, TÍTULO EM INGLÊS, ABSTRACT, KEYWORDS, INTRODUÇÃO, MATERIAL E MÉTODOS, RESULTADOS E DISCUSSÃO, CONCLUSÃO, AGRADECIMENTOS (OPCIONAL), e REFERÊNCIAS.

TÍTULO: deve ser escrito em maiúsculo, negrito, centralizado na página e no **máximo com 15 palavras**. Com a chamada de rodapé numérica, extraída do título, devem constar informações sobre a natureza do trabalho (se extraído de tese/dissertação) e referências às instituições colaboradoras. Os títulos das demais seções da estrutura (resumo, palavras-chave, abstract, keywords, introdução, material e métodos, resultados e discussão, conclusão, agradecimentos e referências) deverão ser escritos em letra maiúscula, negrito e justificado à esquerda.

AUTOR(ES): nomes completos (sem abreviaturas), em letra maiúscula, um após o outro, separados por vírgula e centralizados na linha. Como nota de rodapé na primeira página, indicar, para cada autor, afiliação completa (departamento, centro, instituição, cidade, país), endereço completo e e-mail do autor correspondente. Este deve ser indicado por um “*”. Só serão aceitos, no máximo, cinco autores. Caso ultrapasse esse limite, os autores precisam comprovar que a pesquisa foi desenvolvida em regiões diferentes.

Na primeira versão do artigo submetido, os nomes dos autores e a nota de rodapé com os endereços deverão ser omitidos.

Para a inserção do(s) nome(s) do(s) autor(es) e do(s) endereço(s) na **versão final do artigo** deve observar o padrão no último número da Revista Caatinga (<http://caatinga.ufersa.edu.br/index.php/sistema>).

RESUMO E ABSTRACT: no **mínimo 100** e no **máximo 250 palavras**.

PALAVRAS-CHAVE E KEYWORDS: em negrito, com a primeira letra maiúscula. Devem ter, no mínimo, três e, no máximo, cinco palavras, não constantes no Título/Title e separadas por ponto (consultar modelo de artigo).

Obs. Em se tratando de artigo escrito em idioma estrangeiro (Inglês ou Espanhol), o título, resumo e palavras-chave deverão, também, constar em Português, mas com a sequência alterada, vindo primeiro no idioma estrangeiro.

INTRODUÇÃO: dever ter, **no máximo, 550 palavras**, contendo citações atuais que apresentem relação com o assunto abordado na pesquisa.

CITAÇÕES DE AUTORES NO TEXTO: devem ser observadas as normas da ABNT, NBR 10520 de agosto/2002.

Ex: Torres (2008) ou (TORRES, 2008); com dois autores, usar Torres e Marcos Filho (2002) ou (TORRES; MARCOS FILHO, 2002); com mais de três autores, usar Torres et al. (2002) ou (TORRES et al., 2002).

TABELAS: serão numeradas consecutivamente com algarismos arábicos na parte superior. **Não usar linhas verticais.** As linhas horizontais devem ser usadas para separar o título do cabeçalho e este do conteúdo, além de uma no final da tabela. Cada dado deve ocupar uma célula distinta. Não usar negrito ou letra maiúscula no cabeçalho. Recomenda-se que as tabelas apresentem 8,2 cm de largura, não sendo superior a 17 cm (consulte o modelo de artigo), acessando a página da Revista Caatinga (<http://periodico.caatinga.ufersa.edu.br/index.php/sistema>) no item **LINKS**.

FIGURAS: gráficos, fotografias ou desenhos levarão a denominação geral de **Figura** sucedida de numeração arábica crescente e legenda na parte inferior. As figuras devem apresentar 8,5 cm de largura, não sendo superior a 17 cm. A fonte empregada deve ser a Times New Roman, corpo 10 e não usar negrito na identificação dos eixos. As linhas dos eixos devem apresentar uma espessura de 1,5 mm de cor preta. A Revista Caatinga reserva-se ao direito de não aceitar tabelas e/ou figuras com o papel na forma “paisagem” ou que apresentem mais de 17 cm de largura. **Tabelas e Figuras devem ser inseridas logo após à sua primeira citação.**

EQUAÇÕES: devem ser digitadas usando o editor de equações do Word, com a fonte Times New Roman. As equações devem receber uma numeração arábica crescente. As equações devem apresentar o seguinte padrão de tamanho:

Inteiro = 12 pt

Subscrito/sobrescrito = 8 pt

Sub-subscrito/sobrescrito = 5 pt

Símbolo = 18 pt

Subsímbolo = 14 pt

Estas definições são encontradas no editor de equação no Word.

AGRADECIMENTOS: logo após as conclusões poderão vir os agradecimentos a pessoas ou instituições, indicando, de forma clara, as razões pelas quais os faz.

REFERÊNCIAS: devem ser digitadas em espaço 1,5 cm e separadas entre si pelo mesmo espaço (1,5 cm).

Precisam ser apresentadas em ordem alfabética de autores, alinhado a esquerda e de acordo com a NBR 6023 de agosto/2002 da ABNT.

UM PERCENTUAL DE 60% DO TOTAL DAS REFERÊNCIAS DEVERÁ SER ORIUNDO DE PERIÓDICOS CIENTÍFICOS INDEXADOS COM DATA DE PUBLICAÇÃO INFERIOR A 10 ANOS.

O título do periódico não deve ser abreviado e recomenda-se um total de 20 a 30 referências. **EVITE CITAR RESUMOS E TRABALHOS APRESENTADOS E PUBLICADOS EM CONGRESSOS E SIMILARES.**

EXEMPLOS CITANDO DIFERENTES DOCUMENTOS

a) ARTIGOS DE PERIÓDICOS:

Até 3 (três) autores

TORRES, S. B.; PAIVA, E. P. PEDRO, A. R. Teste de deterioração controlada para avaliação da qualidade fisiológica de sementes de jiló. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 0, n. 0, p. 00-00, 2010.

Acima de 3 (três) autores

BAKKE, I. A. et al. Water and sodium chloride effects on *Mimosa tenuiflora* (Willd.) poiret seed germination. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 19, n. 3, p. 261-267, 2006.

Grau de parentesco

HOLANDA NETO, J. P. **Método de enxertia em cajueiro-anão-precoce sob condições de campo em Mossoró-RN**. 1995. 26 f. Monografia (Graduação em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura de Mossoró, Mossoró, 1995.

COSTA SOBRINHO, João da Silva. Cultura do melão. **Cuiabá**: Prefeitura de Cuiabá, 2005.

Local*

O nome do **local (cidade) de publicação** deve ser indicado tal como figura no documento.

COSTA, J. **Marcas do passado**. Curitiba: UEL, 1995. 530 p.

*Orientações utilizáveis para os mais variados formatos de documentos.

OLIVEIRA, A. I.; LEONARDOS, O. H. **Geologia do Brasil**. 3. ed. Mossoró: ESAM, 1978. 813 p. (Coleção mossoroense, 72).

No caso dos **homônimos de cidades**, acrescenta-se o nome do estado, do país etc.

Viçosa, AL
Viçosa, MG
Viçosa, RJ
Viçosa, RN

Exemplo:

BERGER, P. G. et al. Peletização de sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) com carbonato de cálcio, rizóbio e molibdênio. **Revista Ceres**, Viçosa, MG, v. 42, n. 243, p. 562-574, 1995.

Quando houver **mais de um local** para uma só editora, indica-se o primeiro ou o mais destacado.

SWOKOWSKI, E. W.; FLORES, V. R. L. F.; MORENO, M. Q. **Cálculo de geometria analítica**. Tradução de Alfredo Alves de Faria. 2. ed. São Paulo: Makron Books do Brasil, 1994. 2 v.

Nota – Na obra: São Paulo – Rio de Janeiro – Lisboa – Buenos Aires – Guatemala – México – New York – Santiago

Quando a **cidade não aparece** no documento, mas pode ser identificada, indica-se entre colchetes.

LAZZARINI NETO, S. **Cria e recria**. [São Paulo]: SDF Editores, 1994. 108 p.

Não sendo possível determinar o local, utiliza-se a expressão *sine loco*, abreviada, entre colchetes [S.l.].

KRIGER, G.; NOVAES, L. A.; FARIA, T. **Todos os sócios do presidente**. 3. ed. [S.l.]: Scritta, 1992. 195 p.

b) LIVROS OU FOLHETOS, NO TODO:

RESENDE, M. et al. **Pedologia**: base para distinção de ambientes. 2. ed. Viçosa, MG: NEPUT, 1997. 367 p.

OLIVEIRA, A. I.; LEONARDOS, O. H. **Geologia do Brasil**. 3. ed. Mossoró: ESAM, 1978. 813 p. (Coleção mossoroense, 72).

PISKUNOV, N. **Calculo diferencial e integral**. Tradução de K. Medikov. 6. ed. Moscou: Editorial Mir, 1983. 519p.

c) LIVROS OU FOLHETOS, EM PARTE (CAPÍTULO DE LIVRO):

BALMER, E.; PEREIRA, O. A. P. Doenças do milho. In: PATERNIANI, E.; VIEGAS, G. P. (Ed.). **Melhoramento e produção do milho**. Campinas: Fundação Cargill, 1987. v. 2, cap. 14, p. 595-634.

QUANDO O AUTOR OU ORGANIZADOR DA OBRA POSSUI UM CAPÍTULO NO LIVRO/FOLHETO:

MEMÓRIA, J. M. P. Considerações sobre a experimentação agronômica: métodos para aumentar a exatidão e a precisão dos experimentos. In: _____. **Curso de estatística aplicada à pesquisa científica**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 1973. cap. 1, p. 216-226.

d) MONOGRAFIAS, TESES E DISSERTAÇÕES:

HOLANDA NETO, J. P. **Método de enxertia em cajueiro-anão-precoce sob condições de campo em Mossoró-RN**. 1995. 26 f. Monografia (Graduação em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura de Mossoró, Mossoró, 1995.

e) ARTIGOS PUBLICADOS EM ANAIS DE CONGRESSOS, SIMPÓSIOS, REUNIÕES ETC.:

BALLONI, A. E.; KAGEYAMA, P. Y.; CORRADINI, I. Efeito do tamanho da semente de *Eucalyptus grandis* sobre o vigor das mudas no viveiro e no campo. In: CONGRESSO FLORESTAL BRASILEIRO, 3., 1978, Manaus. **Anais...** Manaus: UFAM, 1978. p. 41-43.

f) LITERATURA NÃO PUBLICADA, MIMEOGRAFIADA, DATILOGRAFIADA ETC.:

GURGEL, J. J. S. **Relatório anual de pesca e piscicultura do DNOCS**. Fortaleza: DNOCS, 1989. 27 p. Datilografado.

g) LITERATURA CUJA AUTORIA É UMA OU MAIS PESSOAS JURÍDICAS:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação – referências – elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 24 p.

h) LITERATURA SEM AUTORIA EXPRESSA:

NOVAS Técnicas – Revestimento de sementes facilita o plantio. **Globo Rural**, São Paulo, v. 9, n. 107, p. 7-9, jun. 1994.

i) DOCUMENTO CARTOGRÁFICO:

INSTITUTO GEOGRÁFICO E CARTOGRÁFICO (São Paulo, SP). **Regiões de governo do Estado de São Paulo**. São Paulo, 1994. 1 atlas. Escala 1:2.000.

J) EM MEIO ELETRÔNICO (CD E INTERNET):

GUNCHO, M. R. A educação à distância e a biblioteca universitária. In: SEMINÁRIO DE BIBLIOTECAS UNIVERSITÁRIAS, 10., 1998, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza: Tec Treina, 1998. 1 CD-ROM.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do abastecimento. **SNPC – Lista de Cultivares protegidas**. Disponível em: <<http://agricultura.gov.br/scpn/list/200.htm>>. Acesso em: 08 set. 2008.

GOMES, C. C. **Como controlar formigas de forma alternativas**. Disponível em: <<http://www.agrisustentavel.com/ta/formigas.htm>>. Acesso em: 07 jun. 2004.

UNIDADES E SÍMBOLOS DO SISTEMA INTERNACIONAL ADOTADOS PELA REVISTA CAATINGA

Grandezas básicas Unidades Símbolos Exemplos

Comprimento metro m

Massa quilograma quilograma kg

Tempo segundo s

Corrente elétrica amper A

Temperatura termodinâmica Kelvin K

Quantidade de substância mol mol

Unidades derivadas

Velocidade --- m s⁻¹ 343 m s⁻¹

Aceleração --- m s⁻² 9,8 m s⁻²

Volume Metro cúbico, litro M3, L* 1 m3,1 000 L*	Concentração Mol/metro cúbico Mol m-3 500 mol m-3
Frequência Hertz Hz 10 Hz	Condutância elétrica siemens S 300 S
Massa específica --- Kg m-3 1.000 kg m-3	Condutividade elétrica desiemens/metro dS m-1 5 dS m-1
Força newton N 15 N	Temperatura
Pressão pascal pa 1,013.105 Pa	Ângulo
Energia joule J 4 J	Porcentagem
Potência watt W 500 W	Grau Celsius
Calor específico --- J (kg 0C)-1 4186 J (kg 0C)-1	Grau
Calor latente --- J kg-1 2,26.106 J kg-1	---
Carga elétrica coulomb C 1 C	0C
Potencial elétrico volt V 25 V	0
Resistência elétrica ohm _ 29_	%
Intensidade de energia Watts/metros quadrado	25 0C
W m-2 1.372 W m-2	300
	45%

Números mencionados em sequência devem ser separados por **ponto e vírgula (;)**. Ex: 2,5; 4,8; 5,3

3 OBSERVAÇÕES PERTINENTES - REVISTA CAATINGA

a) REFERENTE AO TRABALHO

b)

1. O trabalho é original?
2. O trabalho representa uma contribuição científica para a área de Ciências Agrárias?
3. O trabalho está sendo enviado com exclusividade para a Revista Caatinga?

b) REFERENTE À FORMATAÇÃO

1. O trabalho pronto para ser submetido online está omitindo os nomes dos autores?
2. O trabalho contém no máximo 20 páginas, está no formato A4, digitado em espaço 1,5 cm; fonte Times New Roman, tamanho 12, incluindo títulos e subtítulos?
3. As margens foram colocadas a 2,5 cm, a numeração de páginas foi colocada na margem inferior, à direita e as linhas foram numeradas de forma contínua?
4. O recuo do parágrafo de 1 cm foi definido na formatação do parágrafo? Lembre-se que a revista não aceita recuo de parágrafo usando a tecla "TAB" ou a "barra de espaço".
5. A estrutura do trabalho está de acordo com as normas, ou seja, segue a seguinte ordem: título, autor(es), resumo, palavras-chave, título em inglês, abstract, keywords, introdução, material e métodos, resultados e discussão, conclusões, agradecimentos (opcional) e referências?
6. O título contém no máximo 15 palavras?
7. O resumo bem como o abstract apresentam no máximo 250 palavras?
8. As palavras-chave contêm entre três e cinco termos, iniciam com letra maiúscula e separadas por ponto?
9. A introdução contém citações atuais que apresentam relação com o assunto abordado na pesquisa; apresenta no máximo 550 palavras?
10. As citações apresentadas na introdução foram empregadas para fundamentar a discussão dos resultados?
11. As citações estão de acordo com as normas da revista?
12. As tabelas e figuras estão formatadas de acordo com as normas da revista e estão inseridas logo em seguida à sua primeira citação? Lembre-se, não é permitido usar "enter" nas células que compõem a(s) tabela(s).
13. A(s) tabela(s), se existente, está no formato retrato?
14. A(s) figura(s) apresenta qualidade superior (resolução com no mínimo 500 dpis)?
15. As unidades e símbolos utilizados no seu trabalho se encontram dentro das normas do Sistema Internacional adotado pela Revista Caatinga?
16. Os números estão separados por ponto e vírgula? Ex: 0,0; 2,0; 3,5; 4,0
17. As unidades estão separadas do número por um espaço? Ex: 5 m; 18 km; Exceção: 40%; 15%.
18. O seu trabalho apresenta entre 20 e 30 referências sendo 60% destas publicadas com menos de 10 anos em periódicos indexados?
19. Todas as referências estão citadas ao longo do texto?

20. Todas as referências citadas ao longo do texto estão corretamente descritas, conforme as normas da revista, e aparecem listadas?

c) DEMAIS OBSERVAÇÕES

1. Caso as normas da revista não forem seguidas rigorosamente, seu trabalho não irá tramitar. Portanto, é melhor retardar o envio por mais alguns dias e conferir todas as normas. Recomenda-se consultar sempre o último número da Revista Caatinga (<http://caatinga.ufersa.edu.br/index.php/sistema>), isso poderá lhe ajudar a esclarecer algumas dúvidas.

2. Procure sempre acompanhar a situação de seu trabalho pela página da revista (<http://caatinga.ufersa.edu.br/index.php/sistema>).

3) Esta lista de verificação não substitui a revisão técnica da Revista Caatinga, a qual todos os artigos enviados serão submetidos.

4) Os artigos serão publicados conforme a ordem de aprovação.

REFERÊNCIAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6021**: informação e documentação – publicação periódica científica impressa – apresentação. Rio de Janeiro: ABNT, 2003. 9 p.

_____. **NBR 6022**: informação e documentação – artigo em publicação periódica científica impressa – apresentação. Rio de Janeiro: ABNT, 2003. 5 p.

_____. **NBR 6023**: informação e documentação – referências – elaboração. Rio de Janeiro: ABNT, 2002. 24 p.

_____. **NBR 6028**: informação e documentação – resumo – apresentação. Rio de Janeiro: ABNT, 2003. 2 p.

_____. **NBR 10520**: informação e documentação – citações em documentos – apresentação. Rio de Janeiro: ABNT, 2002. 7 p.